



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE QUELADOS DE ÁCIDO CÍTRICO CON CATIONES DIVALENTES

Trabajo final de grado

Ingeniería de Sistemas Biológicos

Autor: Jorge Cadenas Ramírez

Tutores:

Francisco Luis Sepulcre Sanchez

Montserrat Pujolà Cunill

17 / julio / 2020

Resumen

El objetivo de este estudio ha sido la caracterización de quelados de ácido cítrico con cationes divalentes (hierro, cobre y zinc) mediante las técnicas FTIR, XRD, punto de fusión y observaciones macroscópicas para sustentar con esta la estructura molecular que forman dichos quelados. Para lograr esto se ha cristalizado el quelado mediante el proceso de precipitación, cambiando las variables pH y relación molar en el caso del catión hierro, dando como resultado la no cristalización de estos a un pH superior a 3,15 (primer pK del ácido cítrico) y tampoco la cristalización de quelados de ácido cítrico con zinc usando como donante del catión el cloruro de zinc. Después de la caracterización de los cristales obtenidos, y respaldado por los espectros FTIR y XRD, se llega a la conclusión que en el caso del quelado de hierro se han formado múltiples geometrías en una misma muestra, dejando en evidencia la falta de una caracterización a un pH por encima del pK. En el caso del cobre, las diferencias en los espectros FTIR y XRD junto con la caracterización macroscópica de los cristales, nos permite afirmar que sí se ha logrado una quelación del ácido cítrico al cobre, aun así, los múltiples planos de refracción obtenidos en el XRD no permiten elucidar las interacciones moleculares entre el cobre y los grupos carboxilos del ácido cítrico.

Resum

L'objectiu d'aquest estudi ha sigut la caracterització de quelats d'àcid cítric amb cations divalents (ferro, coure y zinc) mitjançant les tècniques FTIR, XRD, punt de fusió i observacions macroscòpiques per sustentar amb aquesta l'estructura molecular que formen aquests quelats. Per aconseguir això s'ha cristal·litzat el quelat mitjançant el procés de precipitació, canviant les variables pH i relació molar en el cas del catió ferro, donant com a resultat la no cristal·lització d'aquests a un pH superior a 3,15 (primer pK de l'àcid cítric) i tampoc la cristal·lització de quelats d'àcid cítric amb zinc utilitzant com donant del catió el clorur de zinc. Després de la caracterització dels cristalls obtinguts, i recolzat pels espectres FTIR i XRD, s'arriba a la conclusió que en el cas del quelat de ferro s'ha format múltiples geometries en una mateixa mostra, deixant en evidència la falta d'una caracterització a un pH per sobre del pK. En el cas del coure, les diferències en els espectres FTIR i XXRD junt amb la caracterització macroscòpica dels cristalls, ens permet afirmar que sí s'ha aconseguit una quelació de l'àcid cítric al coure, encara i així, els múltiples plans de refracció obtinguts en el XRD no permeten elucidar les interaccions moleculars entre el coure i els grups carboxils de l'àcid cítric.

Abstract

The objective of this study has been the characterization of citric acid chelates with divalent cations (iron, copper, and zinc) by FTIR and XRD testing, melting point and macroscopic observations to support with this the molecular structure that these chelates form. To achieve this, the chelation has been crystallized by the precipitation process, changing the pH and molar ratio variables in the case of the iron cation, resulting in their non-crystallization at a pH greater than 3.15 (first pK of citric acid) and neither the crystallization of citric acid chelates with zinc using zinc chloride as cation donator. After the characterization of the crystals obtained, and supported by FTIR and XRD spectra, it is concluded that in the case of iron chelation, multiple geometries have been formed in the same sample, leaving evident the lack of characterization at pH above pK. In the case of copper, the differences in the FTIR and XRD spectra, and adding the macroscopic characterization of the crystals, allow to affirm that a chelation of citric acid to copper has been achieved, even so, the multiple planes of refraction obtained by XRD do not elucidate the molecular interactions between copper and the carboxyl groups of citric acid.

Sumario

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Contexto actual	13
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Materiales.....	17
3.1.1. Reactivos	17
3.1.2. Aparatos	17
3.2. Métodos	18
3.2.1. Composición de los cristales	18
3.2.2. Formación de los cristales	20
3.2.3. Punto de fusión	24
3.2.4. FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) – Mediciones realizadas por la Lebanese University, Hadat Campus con un espectrofotómetro infrarrojo marca JASCO FTIR-6300	25
3.2.5. XRD (X-Ray Diffraction) Mediciones realizadas por la Lebanese University, Hadat Campus con un difractómetro de rayos X marca Bruker K8 Advance AXS GMBH	27
4. RESULTADOS	30
4.1. Propiedades macroscópicas.....	33
4.1.1. Color	33
4.1.2. Tamaño.....	35
4.1.3. Fragilidad	37
4.1.4. Peso y rendimiento del proceso de cristalización	37
4.2. Punto de fusión	39
4.3. Espectros FTIR	41
4.3.1. Quelación citrato – hierro	43
4.3.2. Quelación citrato – cobre.....	48
4.4. Espectros XRD.....	50
4.4.1. Quelación citrato – hierro	50



4.4.2. Quelación citrato – cobre.....	52
5. DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	58
BIBLIOGRAFÍA	59
5.1. Referencias bibliográficas	59

Índice de figuras

Figura 1-1 Esquematización de la microencapsulación.	13
Figura 2-1 Gráfica de barras con el número de publicaciones con las palabras clave “food supplement chelate” y “food supplement microencapsulation”. Fuente: PubMed.	15
Figura 3-1 Esquematización del proceso experimental llevado a cabo.	21
Figura 3-2 Gráfica de la curva de titulación del ácido cítrico.	22
Figura 3-3 Estructura de las uniones entre metal y grupo carboxilo según la interacción metal-ligando. (I) Forma iónica descoordinada, (II) coordinación unidentada, (III) coordinación quelante bidentado, (IV) coordinación de puente bidentado.	23
Figura 3-4 Esquema de las relaciones molares usadas en el catión hierro.	24
Figura 3-5 Esquematización de los diferentes componentes de un aparato medidor de punto de fusión, concretamente el modelo SMP10 de la casa Stuart.	25
Figura 3-6 Procesado de datos mediante transformada de Fourier.	26
Figura 3-7 Tipos de vibraciones moleculares. El símbolo “+” indica un movimiento desde la página hacia el lector.	27
Figura 3-8 Diagrama representativo de la Ley de Bragg. a la izquierda las ondas emergentes están en fase y se observa difracción a un ángulo 2θ respecto al haz incidente. A la derecha la Ley de Bragg no se cumple, las ondas emergentes están desfasadas y no observa difracción.	28
Figura 3-9 Diagrama del funcionamiento de un difractómetro de rayos X con geometría Bragg-Brentano.	29
Figura 4-1 Mezcla de componentes en agitación continua.	30
Figura 4-2 Reposo en cámara frigorífica.	30



Figura 4-3 Precipitación de los cristales. _____	31
Figura 4-4 Filtrado de los cristales en Kitasato. _____	31
Figura 4-5 Secado de los cristales. _____	31
Figura 4-6 Fotografía tomada a dos muestras con pH superiores a 3,15. _____	32
Figura 4-7 Fotografía tomada del $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ usado para la preparación de los cristales. _____	33
Figura 4-8 Esquema fotográfico e interpretativo de los cristales provenientes del sulfato de hierro. _____	34
Figura 4-9 Esquema fotográfico e interpretativo de los cristales provenientes de la sal de Mohr y del sulfato de cobre. _____	35
Figura 4-10 Fotografía del cristal de citrato de hierro con relación molar 1:2 proveniente del sulfato de hierro. _____	36
Figura 4-11 Aparato usado para la medición del punto de fusión. _____	39
Figura 4-12 Fotografías tomadas del proceso de obtención de los puntos de fusión. _____	40
Figura 4-13 Espectro FTIR comparando las repeticiones 1 y 2 del quelado de citrato de hierro con la relación molar 1:2. _____	43
Figura 4-14 Espectro FTIR comparando las repeticiones 1 y 2 del quelado de citrato de hierro con la relación molar 1:3. _____	44
Figura 4-15 Espectro FTIR de 400 a 2000 cm^{-1} comparando ácido cítrico con los diferentes quelados de hierro obtenidos. _____	45
Figura 4-16 Espectro FTIR de 2000 a 4000 cm^{-1} comparando ácido cítrico con los diferentes quelados de hierro obtenidos. _____	46
Figura 4-17 Esquema de las posibles relaciones molares propuestas en el catión hierro comparadas con las transmitancias de los espectros FTIR. _____	47

- Figura 4-18 Espectro FTIR de 400 a 2000 cm^{-1} comparando los diferentes quelados de hierro obtenidos y el sulfato de hierro. _____ 47
- Figura 4-19 Espectro FTIR de 2000 a 4000 cm^{-1} comparando los diferentes quelados de hierro obtenidos y el sulfato de hierro. _____ 48
- Figura 4-20 Espectro FTIR comparando ácido cítrico con el quelado obtenido de cobre y el sulfato de cobre. _____ 49
- Figura 4-21 Espectro FTIR comparando ácido cítrico con el quelado obtenido de cobre y el sulfato de cobre. _____ 49
- Figura 4-22 Espectro XRD comparando las repeticiones 1 y 2 del quelado de citrato de hierro con la relación molar 1:2. _____ 50
- Figura 4-23 Espectro XRD comparando las repeticiones 1 y 2 del quelado de citrato de hierro con la relación molar 1:3. _____ 51
- Figura 4-24 Espectro XRD de ácido cítrico y los diferentes quelados de hierro obtenidos. _____ 52
- Figura 4-25 Espectro XRD comparando ácido cítrico con el quelado obtenido de cobre y el sulfato de cobre. _____ 53



Índice de tablas

Tabla 3-1 Resumen de las relaciones estequiométricas y cantidades de sales usadas para formar los cristales con sulfato de hierro.	19
Tabla 3-2 Resumen de las cantidades de sales usadas para formar los cristales de Cu, Zn y Fe.	20
Tabla 4-1 Resumen de las medidas realizadas con un pie de rey de los diferentes cristales.	36
Tabla 4-2 Resumen de los pesos experimentales de los componentes y los cristales obtenidos junto con el rendimiento calculado.	38
Tabla 4-3 Resultados de la temperatura de fusión de los diferentes cristales.	40
Tabla 4-4 Tabla con los picos más importantes de las diferentes muestras y sus características.	42

1. Introducción

“La nutrición es uno de los pilares de la salud y el desarrollo. La mejora de la nutrición pasa por promover la salud de las madres, los lactantes y los niños pequeños; reforzar nuestro sistema inmunitario; disminuir las complicaciones durante el embarazo y el parto; reducir el riesgo de sufrir enfermedades no transmisibles (como la diabetes y las enfermedades cardiovasculares), y prolongar la vida”

Organización Mundial de la Salud, Temas de Nutrición (2017) [1]

En la actualidad, las necesidades sociales sobre nutrición tienen un impacto constante alrededor del mundo, en algunas situaciones por excesos y en otras por carencia de nutrientes y/o alimentos, el mundo se enfrenta directamente con los signos de la pobreza, el desequilibrio y las cargas económicas que supone la creación de soluciones rápidas que en muchos casos son poco eficientes y de difícil acceso, la desnutrición y la malnutrición generan impacto directo en áreas como el desarrollo, el crecimiento, la adquisición de conocimiento y el adecuado funcionamiento psicológico.

La carencia de hierro, zinc y cobre son algunas de las insuficiencias más comunes y efectúan trastornos en la nutrición, la carencia de hierro es en la actualidad un factor de riesgo de salud social pues se encuentra en déficit en muchos países bien sean en vías de desarrollo o países industrializados.

La importancia del hierro en la actualidad tiene diversos impactos a nivel social, es un suplemento indicado especialmente en mujeres embarazadas y personas con enfermedades como la anemia.

“El cuerpo utiliza el hierro para fabricar la hemoglobina, una proteína de los glóbulos rojos que transporta el oxígeno de los pulmones a distintas partes del cuerpo, y la mioglobina, una proteína que provee oxígeno a los músculos. El cuerpo también requiere hierro para elaborar hormonas y tejido conectivo”

National Institutes of Health, Office of dietary Supplements (2016) [2]



Los niveles de hierro se miden por los niveles de ferritina en suero o plasma, ya que esta es una proteína que lo almacena. Según la OMS [3][1], para menores de 5 años de edad se establece el valor de ferritina en 12 µg/L y para personas de 5 años o mayores el valor se establece en 15 µg/L.

Cuando no se llega a la cantidad de hierro necesario en el cuerpo no solo no hay transporte adecuado de oxígeno por el mismo, sino adicionalmente la fabricación de algunas hormonas se ve afectada y esto genera impacto en el funcionamiento corporal, es importante resaltar que el hierro se encuentra en alimentos como la carne o verduras de tonalidades oscuras sin embargo, la necesidad de la ingesta de suplementos de hierro se da por la insuficiencia de estos productos en muchos pacientes y por lo tanto es importante plantear estudios e investigaciones que potencien la eficacia en los procesos de absorción y provea alternativas efectivas para el diseño, distribución y consumo del mismo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la cifra de anemias en mujeres en edad fecunda actualmente llega a 500 millones. Propone la reducción en un 50 % para 2025 con ayuda de la ingesta de suplementos de hierro [4].

Por otro lado, el cobre es un mineral necesario para mantener una buena salud puesto que cumple funciones vitales como interactuar en las reacciones químicas productoras de energía, tejidos y vasos sanguíneos y permite al sistema nervioso mantenerse activo. Las cantidades de cobre que requiere el cuerpo varían según la edad, se encuentran comprendidas entre 70 y 140 µg/dL. Los seres humanos pueden obtener este mineral de forma natural a través del consumo de alimentos como el hígado de vaca, el marisco, las nueces o hasta los champiñones, sin embargo en muchas ocasiones es necesario ingerir suplementos multivitamínicos que lo contengan, normalmente se presenta en diferentes tipos como óxido cúprico o gluconato de cobre pero se desconoce cuál es la forma más efectiva para ser absorbido por el cuerpo. Normalmente las personas con enfermedades celiacas o que consumen altas dosis de zinc tienen índices bajos de absorción de cobre y por lo tanto tienen deficiencias del mismo.

“La deficiencia de cobre puede causar cansancio extremo, parches claros en la piel, altas concentraciones de colesterol en la sangre y trastornos del tejido conectivo que afectan los ligamentos y la piel. Otros efectos de la deficiencia de cobre son huesos débiles y quebradizos, pérdida de equilibrio y coordinación, y un mayor riesgo de infección”

National Institutes of Health, Office of dietary Supplements (2019) [5]

Finalmente, el zinc es un nutriente necesario para el ser humano, está presente en todas las células del cuerpo y permite al sistema inmune combatir ante virus y/o bacterias que puedan irrumpir en el cuerpo; se considera al zinc como un elemento que permite la fabricación de proteínas, se requiere en un nivel adecuado especialmente en la infancia, la adolescencia y en el embarazo puesto que además de ser necesario en la síntesis de proteínas, también interviene en la pronta cicatrización de las heridas y regula los sentidos del olfato y el gusto. Los niveles en suero varían según la hora del día y la dieta, por la mañana en ayunas no deben ser menores de 70 $\mu\text{g}/\text{dL}$ para mujeres y no menores de 74 $\mu\text{g}/\text{dL}$ para hombres [6].

Diversos alimentos pueden proveer este nutriente al cuerpo, algunos de ellos son las carnes rojas, las ostras, langostas y cangrejos, sin embargo, es posible encontrarlo en suplementos combinados con calcio, magnesio, entre otros, o solo. Estos tienen diferentes tipos de administración, sin embargo, presentaciones como las de ingesta oral tienen contraindicaciones como la asociación de este a la pérdida del sentido del olfato y problemas con el gusto, no obstante, no solo puede impactar en los sentidos sino además proveer problemas neurológicos entre los cuales se han asociado debilidad de extremidades y molestias en manos o dedos. Normalmente las personas que tienen anemia requieren de mayor consumo de zinc.

Un nivel bajo de este nutriente en el cuerpo puede generar problemas como el crecimiento lento en los niños y los bebés, impotencia en los hombres, pérdida de cabello, molestias estomacales que se manifiestan generalmente como diarrea o pérdida de apetito. Actualmente es necesario no solo estudiar el impacto del déficit de este en el cuerpo, especialmente en el sistema inmunitario, sino además en la conexión que esto pueda tener con molestias en la piel, la neumonía y algunas infecciones comunes especialmente en la infancia.

“La deficiencia de zinc también causa pérdida del cabello, diarrea, lesiones en los ojos y la piel y pérdida de apetito. Además, puede provocar pérdida de peso, problemas de cicatrización de heridas, disminución del sentido del gusto y reducción de los niveles de concentración”

National Institutes of Health, Office of dietary Supplements (2016) [7]

El déficit de estos tres cationes, hierro, cobre y zinc se puede corregir con la ingesta de suplementos vitamínicos, pero estos están ligados a su absorción. Aquí es donde está la mayor



problemática, para mejorar esta absorción de los cationes en el organismo se estudia el método de administración de los suplementos, la cual cosa fundamenta esta investigación.

1.1. Contexto actual

El mundo de los suplementos de cationes fisiológicamente activos es muy diverso y se caracteriza por dos metodologías importantes; la primera es el método de recubrimiento del catión, ya que éste provoca un ennegrecimiento de los dientes y un gusto metálico a su ingesta, y la segunda es la ligación del catión a una molécula que hace de vehículo.

El método de la microencapsulación, que se puede observar en la Figura 1-1 [8], pese a ser una tecnología presentada en la década de 1950 por Green y Schleicher, es uno de los procesos más comunes actualmente [9], se define como una tecnología de empaquetado de materiales en miniatura, creando cápsulas selladas que pueden liberar su contenido bajo condiciones específicas [10]. Estas cápsulas tienen un tamaño que va de 5 a 300 micrómetros de diámetro.

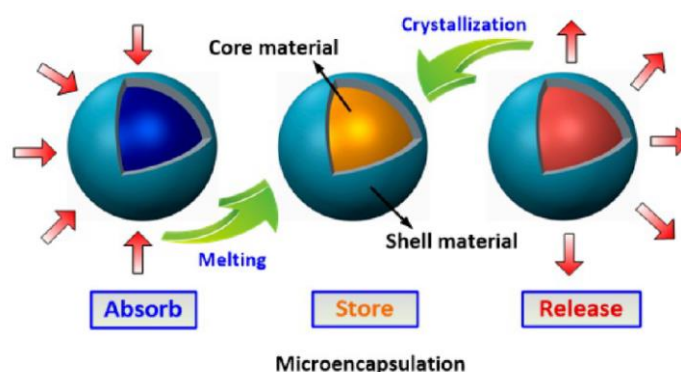


Figura 1-1 Esquematzación de la microencapsulación.

La tecnología actual permite crear microcápsulas que aíslan el contenido de las mismas con las interacciones del exterior, impidiendo por ejemplo la oxidación de compuestos o la percepción organoléptica del paciente que las ingiere, como el ennegrecimiento de dientes mencionado anteriormente, no obstante, esta tecnología utiliza métodos complejos y costosos como el de aspersión, para el cual se necesita un atomizador, o mediante liposomas, que necesitan un sonicador y una inyección de soluciones de lípidos [11], generando un coste adicional de equipos

de alta tecnología que hace que la disponibilidad de suplementos vitamínicos micro encapsulados no esté al abaste de sociedades con medio – bajo poder adquisitivo.

Este método tan complejo lucha contra el problema principal de los suplementos de cationes, su biodisponibilidad, ya que se necesita una liberación de los cationes en un lugar específico del sistema gastrointestinal para que el cuerpo humano pueda absorberlo.

Con el fin de encontrar una técnica que permita una biodisponibilidad apropiada y evitar el coste de la microencapsulación, recientemente se han publicado diversos artículos en referencia a la búsqueda de alternativas [12][13][14], centrándose en crear complejos quelados de cationes con moléculas orgánicas de bajo peso molecular (monosacáridos, aminoácidos y ácidos carboxílicos). La más estudiada es la quelación del hierro al aminoácido glicina (GLY), formando bis-glicinato de hierro con resultados prometedores.

Se ha visto que la biodisponibilidad de los cationes está fuertemente ligada a la coordinación que tienen estos con su molécula quelante, de ahí su interés por conocer su estructura. Se ha realizado un estudio sobre la estructura de la glicina con hierro y con zinc [12], la cual resultó que la molécula de hierro se coordinaba con tres glicinas y la de zinc con dos glicinas. Actualmente se continúa esta línea de investigación en la Universidad Politécnica de Cataluña, de la cual ramifica este trabajo.

Como se mencionó con anterioridad, la actual voluntad de buscar alternativas en los quelados como solución a la microencapsulación se ve plasmada en la Figura 1-2, donde se puede observar una evolución ascendente importante desde 2010 en las publicaciones con las palabras clave “food supplement chelate”.



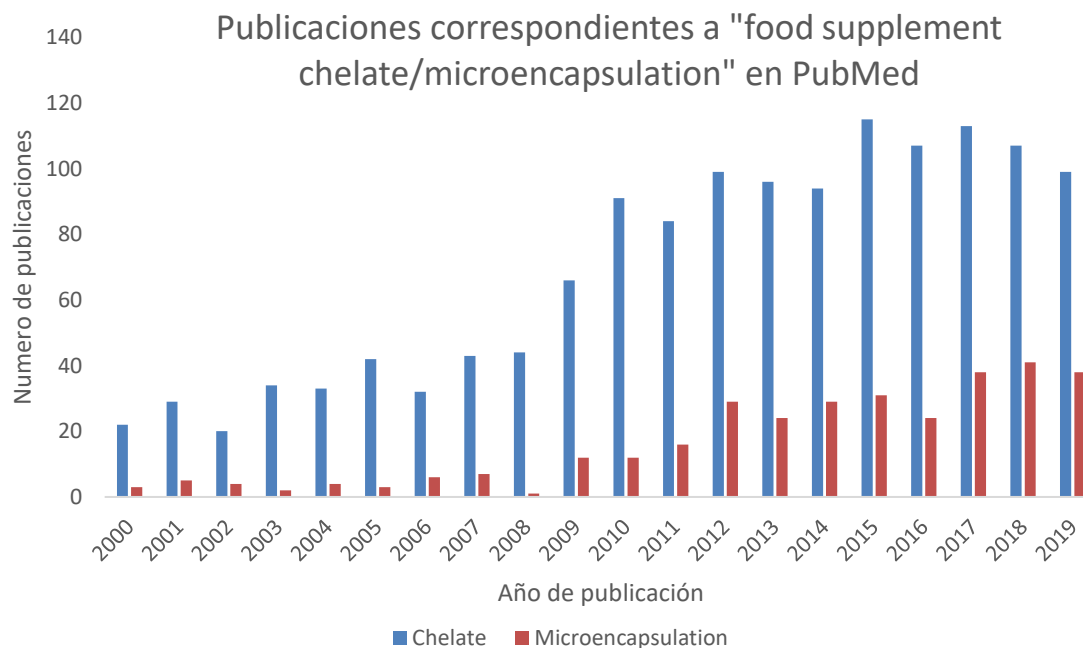


Figura 1-2 Gráfica de barras con el número de publicaciones con las palabras clave “food supplement chelate” y “food supplement microencapsulation”. Fuente: PubMed.

Algunos de estos trabajos con más interés son:

- Clemente Villalba, J. (2017). *Estudio de quelados de glicina mediante espectroscopía FTIR* (Master's thesis, Universitat Politècnica de Catalunya).
- Miller, M. E., McKinnon, L. P., & Walker, E. B. (2015). Quantitative measurement of metal chelation by fourier transform infrared spectroscopy. *Analytical Chemistry Research*, 6, 32-35.
- Yunarti, R. T., Zulys, A., Harahap, L. Y., & Pramukti, M. S. A. (2013). Effectiveness of Iron Fortification on Soy-Based Foods Using Ferrous Bisglycinate in the Presence of Phytic Acid. *Makara Journal of Science*, 11-16.

Con la finalidad de aportar nuevas perspectivas y seguir evolucionando en el campo de la investigación, se ha llevado a cabo un estudio de cristalización para formar el quelado de hierro, cobre y zinc con el ácido cítrico, y cómo éste se ve afectado por el pH al cual se forma.

2. Objetivos

Los estudios realizados hasta la fecha se han centrado en la quelación de los metales con la glicina. Para aportar una perspectiva novedosa en el vasto mundo de los quelados, se optó por dirigir este trabajo hacia la quelación con ácido cítrico. A continuación, se detallan los objetivos planteados para llevar a cabo este estudio.

Los dos objetivos principales son: la obtención de cristales de quelado de ácido cítrico con diferentes cationes de interés fisiológico y la caracterización molecular de estos.

Para obtener los objetivos generales planteados, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- Cristalización:
 - Cristalización del quelado de citrato de hierro a diferentes pH
 - Cristalización del quelado de citrato de hierro a diferentes relaciones molares
 - Cristalización del quelado de citrato de cobre
 - Cristalización del quelado de citrato de zinc
 - Cristalización del ácido cítrico
- Caracterización fisicoquímica de los cristales/productos obtenidos:
 - Color
 - Tamaño
 - Fragilidad
 - Peso y rendimiento del proceso de cristalización
 - Punto de fusión de los quelados
 - Caracterización de los espectros de los cristales mediante FTIR y XDR



3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Reactivos

Los reactivos usados en la elaboración de los cristales fueron los siguientes:

- Ácido cítrico: ACS grado reactivo de la casa Scharlau. Fórmula química: $C_6H_8O_7$. Solubilidad en agua: 133 g / 100 mL
- Sulfato de hierro heptahidratado: PA-ACS de la casa Panreac. Fórmula química: $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$. Solubilidad en agua: 26 g / 100 mL
- Sulfato ferroso amónico hexahidratado (sal de Mohr): químicamente puro de la casa Probus. Fórmula química: $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$. Solubilidad en agua: 26,9 g / 100 mL
- Sulfato de cobre anhidro: USP de la casa Panreac. Fórmula química: $CuSO_4$. Solubilidad en agua: 20,7 g / 100 mL
- Cloruro de zinc: mínimo 98 % de la casa Sigma. Fórmula química: $ZnCl_2$. Solubilidad en agua: 435 g / 100 mL
- Etanol: absoluto $\geq 99,8$ % de la casa Honeywell. Fórmula química: C_2H_5OH
- Agua destilada común. Fórmula química: H_2O

3.1.2. Aparatos

Los equipos de laboratorio usados fueron los siguientes:

- pH metro: pH METER GLP 22 de la casa Crison.
- Agitador magnético: BasicMagMix de la casa Ovan y Agimatic-E de la casa PSelecta.
- Estufa: modelo 207 de la casa PSelecta.
- Aparato para medir el punto d fusión: melting point SMP10 de la casa Stuart.
- FTIR: JASCO FTIR-6300 espectrómetro con $0,07\text{ cm}^{-1}$ de resolución (mediciones realizadas por Lebanese University, Hadat Campus).
- XRD: difractómetro de rayos X Bruker D8 Advance AXS GMBH (mediciones realizadas por Lebanese University, Hadat Campus).

3.2. Métodos

Las mediciones de los espectros FTIR y XRD se realizaron mediante un encargo a la Lebanese University, Hadat Campus, la cual facilitó los datos resultantes en formato Excel y Notepad.

El análisis de datos y la elaboración de gráficas se han realizado posteriormente en la Universidad Politécnica de Cataluña – Escuela Superior de Agricultura de Barcelona por el autor de este trabajo.

3.2.1. Composición de los cristales

Debido a que no se ha encontrado una metodología estándar a seguir para la obtención de cristales de ácido cítrico, este estudio se ha basado en diversos artículos de A. Rammohan en el CRYSTALLOGRAPHY JOURNALS ONLINE [15] y el trabajo de Clemente Villalba, J. (2017), citado anteriormente, con pequeñas modificaciones debido a la naturaleza de los componentes usados.

En base a estos artículos se establecieron tres estequiometrías diferentes; 1:2, 1:3 y 1:4, siendo el primer número la cantidad de moléculas de hierro y el segundo las de ácido cítrico. En el primer caso el quelado resultante constaría de una molécula de hierro enlazada a dos citratos, el segundo caso a tres y el tercer caso a cuatro.

Para calcular las cantidades de sulfato de hierro por cada 20 gramos de ácido cítrico se usaron los cálculos (3-1), (3-2) y (3-3).

$$\begin{aligned}
 & \frac{1 \text{ molec. Fe}}{2 \text{ molec. C}_6\text{H}_8\text{O}_7} \cdot \frac{6,023 \cdot 10^{23} \text{ molec. C}_6\text{H}_8\text{O}_7}{1 \text{ mol C}_6\text{H}_8\text{O}_7} \cdot \frac{1 \text{ mol Fe}}{6,023 \cdot 10^{23} \text{ molec. Fe}} \\
 & \cdot \frac{1 \text{ mol FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}}{1 \text{ mol Fe}} \cdot \frac{278,05 \text{ g FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}}{1 \text{ mol FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}} \\
 & \cdot \frac{1 \text{ mol C}_6\text{H}_8\text{O}_7}{192,12 \text{ g C}_6\text{H}_8\text{O}_7} \cdot 20 \text{ g C}_6\text{H}_8\text{O}_7 = 14,47 \text{ g FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}
 \end{aligned} \tag{3-1}$$



$$\begin{aligned}
 & \frac{1 \text{ molec. Fe}}{3 \text{ molec. C}_6\text{H}_8\text{O}_7} \cdot \frac{6,023 \cdot 10^{23} \text{ molec. C}_6\text{H}_8\text{O}_7}{1 \text{ mol C}_6\text{H}_8\text{O}_7} \cdot \frac{1 \text{ mol Fe}}{6,023 \cdot 10^{23} \text{ molec. Fe}} \\
 & \cdot \frac{1 \text{ mol FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}}{1 \text{ mol Fe}} \cdot \frac{278,05 \text{ g FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}}{1 \text{ mol FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}} \\
 & \cdot \frac{1 \text{ mol C}_6\text{H}_8\text{O}_7}{192,12 \text{ g C}_6\text{H}_8\text{O}_7} \cdot 20 \text{ g C}_6\text{H}_8\text{O}_7 = 9,65 \text{ g FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}
 \end{aligned} \quad (3-2)$$

$$\begin{aligned}
 & \frac{1 \text{ molec. Fe}}{4 \text{ molec. C}_6\text{H}_8\text{O}_7} \cdot \frac{6,023 \cdot 10^{23} \text{ molec. C}_6\text{H}_8\text{O}_7}{1 \text{ mol C}_6\text{H}_8\text{O}_7} \cdot \frac{1 \text{ mol Fe}}{6,023 \cdot 10^{23} \text{ molec. Fe}} \\
 & \cdot \frac{1 \text{ mol FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}}{1 \text{ mol Fe}} \cdot \frac{278,05 \text{ g FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}}{1 \text{ mol FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}} \\
 & \cdot \frac{1 \text{ mol C}_6\text{H}_8\text{O}_7}{192,12 \text{ g C}_6\text{H}_8\text{O}_7} \cdot 20 \text{ g C}_6\text{H}_8\text{O}_7 = 7,24 \text{ g FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}
 \end{aligned} \quad (3-3)$$

En la Tabla 3-1 Es posible ver un resumen de las cantidades de ácido cítrico, sulfato de hierro heptahidratado y agua que se han usado para formar las distintas muestras de citrato de hierro usando como fuente de hierro el sulfato de hierro heptahidratado.

Tabla 3-1 Resumen de las relaciones estequiométricas y cantidades de sales usadas para formar los cristales con sulfato de hierro.

pH	Ácido cítrico (g)	FeSO ₄ · 7 H ₂ O (g)	H ₂ O (mL)	Ácido cítrico (g)	FeSO ₄ · 7 H ₂ O (g)	H ₂ O (mL)	Ácido cítrico (g)	FeSO ₄ · 7 H ₂ O (g)	H ₂ O (mL)
< 3,15	20	14,47	30	20	9,65	20	20	7,24	20
3,15 - 4,77	20	14,47	30	20	9,65	20	20	7,24	20
4,77 - 6,4	20	14,47	30	20	9,65	20	20	7,24	20
> 6,4	20	14,47	30	20	9,65	20	20	7,24	20
Rel.	"1:2" Estequiometría 1			"1:3" Estequiometría 2			"1:4" Estequiometría 3		

En la Tabla 3-2 es posible observar el resumen de las cantidades de sulfato de cobre, sal de Mohr, cloruro de zinc y agua que se han usado para la formación de los cristales de citrato de cobre, citrato de zinc y citrato de hierro usando como fuente de hierro sal de Mohr.

Tabla 3-2 Resumen de las cantidades de sales usadas para formar los cristales de Cu, Zn y Fe.

	Sulfato de cobre			Sal de Mohr			Cloruro de zinc		
<i>Muestra</i>	Ácido cítrico (g)	CuSO ₄ (g)	H ₂ O (mL)	Ácido cítrico (g)	Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6 H ₂ O (g)	H ₂ O (mL)	Ácido cítrico (g)	ZnCl ₂ (g)	H ₂ O (mL)
<i>Con citrato</i>	20	8	20	20	8	20	20	7	20
<i>Sin citrato</i>	0	9	20	0	9	20	-	-	-
Rel.	<i>"1:2"</i> <i>Estequiometría</i>			<i>"1:5"</i> <i>Estequiometría</i>			<i>"1:2"</i> <i>Estequiometría</i>		

3.2.2. Formación de los cristales

El método usado para la cristalización de las muestras ha sido el de precipitación, en la Figura 3-1 se puede ver un esquema breve de los pasos. Consiste en llevar la disolución en caliente a un punto muy concentrado de soluto para que después al enfriarla baje el punto de saturación y el exceso de soluto tenga que precipitar.

Para ello primero se mezclaron los reactivos mencionados en el apartado anterior en agitación continua utilizando un agitador magnético, controlando en todo momento el pH y añadiendo hidróxido sódico para dejar la disolución a un pH concreto, teniendo en cuenta el pK del ácido cítrico. Una vez obtenida la disolución, se dejó en agitación y a una temperatura de 60 °C durante 24 horas. Después se llevó a una temperatura de 4 °C durante un periodo de 3 a 15 días en una cámara frigorífica.

Una vez comprobado que los cristales se habían formado, se procedió a su limpieza, ésta consistió en limpiar los cristales con etanol absoluto, después de filtrar la muestra al vacío en un Kitasato.

Finalmente se secaron los cristales en estufa a 40 °C durante 2 horas.



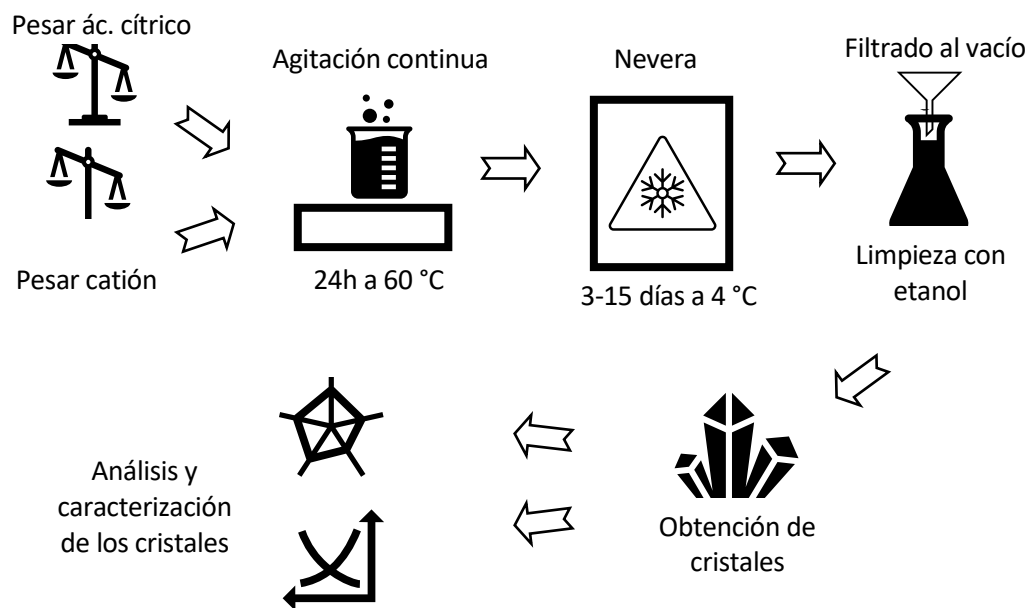


Figura 3-1 Esquematización del proceso experimental llevado a cabo.

3.2.2.1. Importancia del pH

Como se puede observar en la Figura 3-2 el ácido cítrico consta de tres grupos carboxilos (COOH) disociables a diferentes pH, por lo que tiene tres pK, estos grupos carboxilos se disocian del hidrógeno al subir el pH por encima del pK para ese grupo carboxilo; el primero se disocia al subir el pH por encima de 3,15, el segundo por encima de un pH de 4,77 y el último por encima de un pH de 6,4, dando como resultado la forma totalmente disociada del ácido, el citrato, que todos sus grupos carboxílicos se han desprotonado (COO⁻).

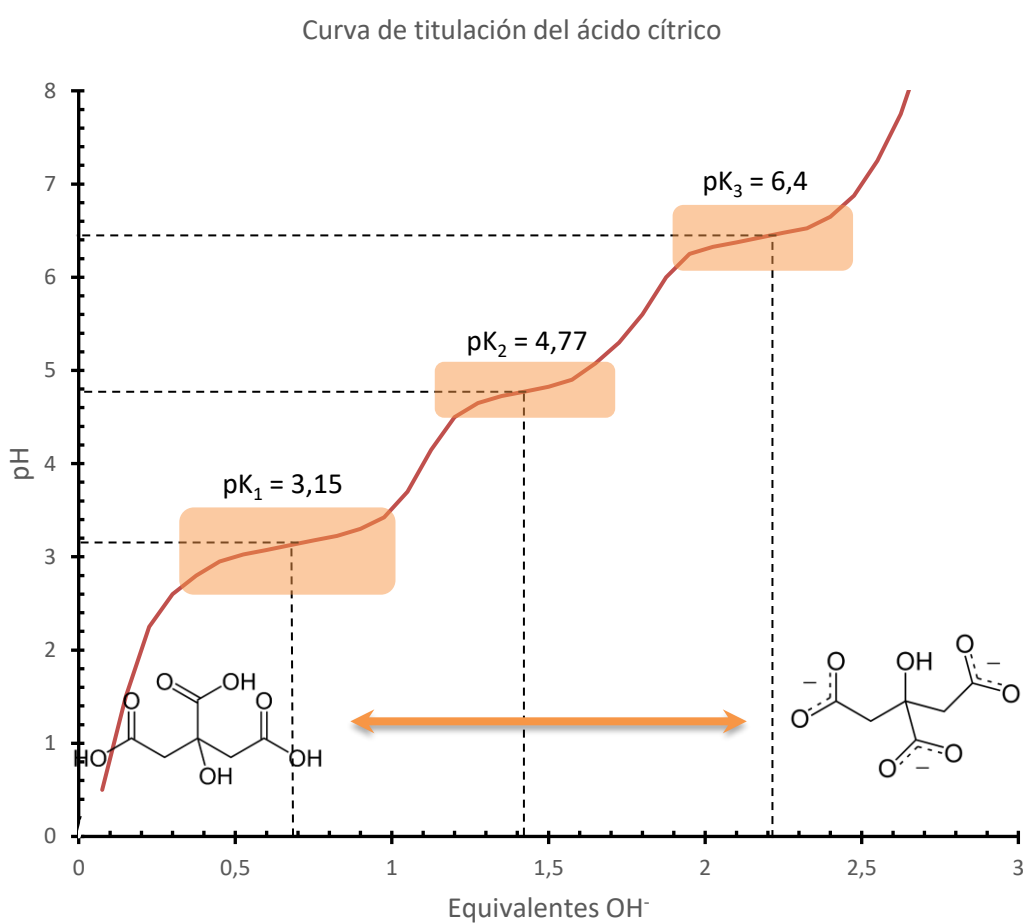


Figura 3-2 Gráfica de la curva de titulación del ácido cítrico.

En este estudio se ha probado la cristalización llevando la disolución a todos los pH entre los pk que hacen que se disocien los diferentes grupos carboxilo, con el fin de observar la mejor

estabilidad del quelado con los diferentes cationes. Esto es un punto crucial ya que la formación del quelado viene afectada por el número de grupos carboxílicos libres (disociados), que tienen carga negativa, ya que estos determinarán la forma tridimensional del ácido cítrico. La forma tridimensional del ácido determinará la facilidad con la que el catión (Fe^{+2} , Cu^{+2} y Zn^{+2}) se encuentre uno de estos grupos carboxílicos libres y se una a él o desplace al hidrógeno en el caso de que esté protonado.

Como se puede ver, el pH es un punto importantísimo para conseguir una quelación estable. Los siguientes estudios apuntan que además de su formación, su estabilidad afecta a su posterior viabilidad como suplemento alimentario, ya que según Lina J. PÉREZ M. y Gloria TOBÓN (2006) *“la constante de estabilidad del quelato debe ser lo suficientemente alta para permitirle atravesar el TGI (tracto gastrointestinal) con mínima hidrólisis, y lo suficientemente baja para que los ligandos citoplasmáticos puedan remover el hierro del quelato absorbido”* [16].

3.2.2.2. Importancia de la relación molar

Dependiendo de la cantidad de sitios donde el ion metálico pueda unirse al ligando (ácido cítrico en el caso de este proyecto) el quelado puede ser iónico, bidentado, tridentado, etc. [17]. El tipo de coordinación del metal al ácido cítrico también varía su estructura, en el caso de un grupo carboxílico se puede ver en la Figura 3-3 como podría ser esta coordinación [18].

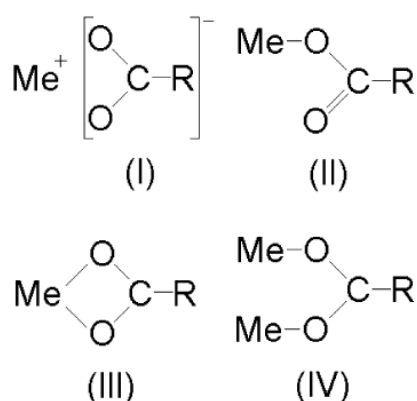


Figura 3-3 Estructura de las uniones entre metal y grupo carboxilo según la interacción metal-ligando. (I) Forma iónica descoordinada, (II) coordinación unidentada, (III) coordinación quelante bidentado, (IV) coordinación de puente bidentado.

Como se ha visto en el apartado anterior, el ácido cítrico cuenta con tres grupos carboxílicos. Puesto que no se conoce cuál es la interacción molecular que presentan los quelados de ácido cítrico con los cationes estudiados, en el caso del hierro se han planteado tres relaciones molares; la primera suponemos un enlace de dos moléculas de citrato con un átomo de hierro, en la segunda suponemos la relación entre tres citratos con un átomo de hierro y en la tercera suponemos la unión de cuatro citratos a un solo átomo de hierro. Estas relaciones se pueden ver de forma esquemática y más clara en la Figura 3-4.

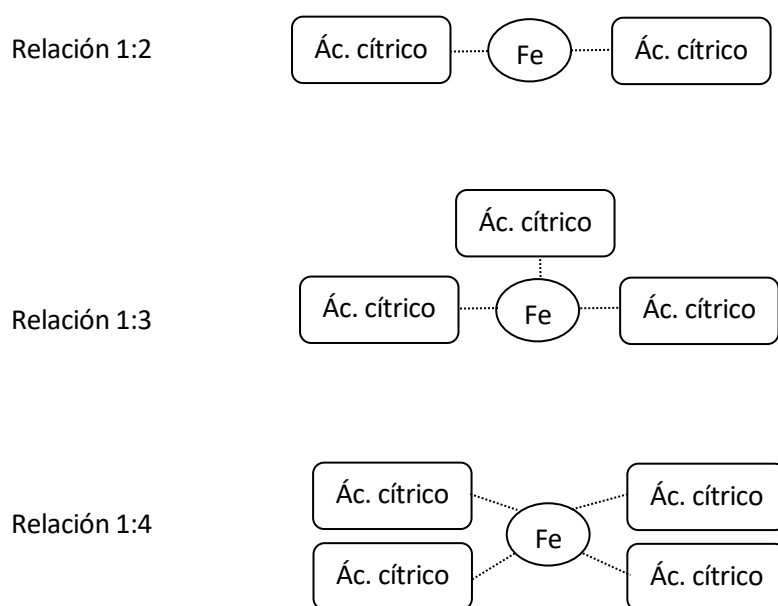


Figura 3-4 Esquema de las relaciones molares usadas en el catión hierro.

Es interesante esta relación ya que de ella dependerá la estabilidad del complejo quelado. En futuros estudios se podría estudiar cual resulta más eficaz de cara a la biodisponibilidad del catión para el ser humano.

3.2.3. Punto de fusión

El punto de fusión de una sustancia es la temperatura a la cual esta pasa de estado sólido a líquido. Para determinar la temperatura de punto de fusión se usa un aparato medidor de punto de fusión, como se aprecia en la Figura 3-5, éste cuenta con un porta muestras, una fuente de calor, un termómetro y una lupa.

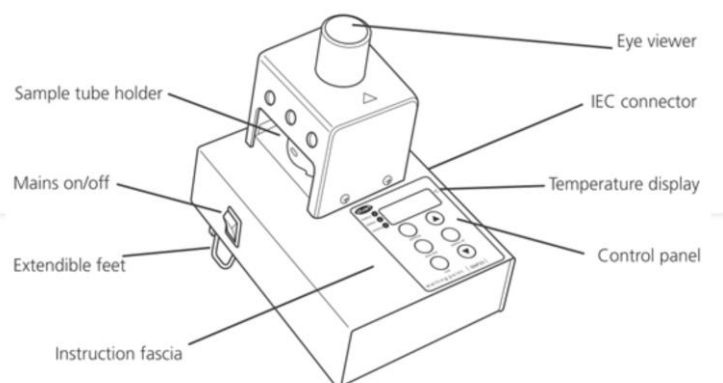


Figura 3-5 Esquematación de los diferentes componentes de un aparato medidor de punto de fusión, concretamente el modelo SMP10 de la casa Stuart.

La muestra se introduce en el aparato a través de capilares transparentes y el usuario verifica por la lupa el estado de la muestra mientras el calor va aumentando lenta y progresivamente. Al observar un cambio de fase en la muestra, se detiene manualmente el aparato y se apunta la temperatura en ese momento.

3.2.4. FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) – Mediciones realizadas por la Lebanese University, Hadat Campus con un espectrofotómetro infrarrojo marca JASCO FTIR-6300

La espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR de sus siglas en inglés) es una técnica de medición basada en las vibraciones de los enlaces entre átomos. Consiste en emitir una radiación infrarroja a través de un interferómetro y luego a través de una muestra. Un espejo móvil dentro del aparato altera la distribución de la luz infrarroja que pasa a través del interferómetro. La señal, llamada interferograma, representa la salida de la luz en función de la posición del espejo. Después se procesan los datos con una técnica llamada transformada de Fourier que los convierte en el resultado deseado. En la Figura 3-6 se puede observar un ejemplo del resultado del procesamiento de datos.

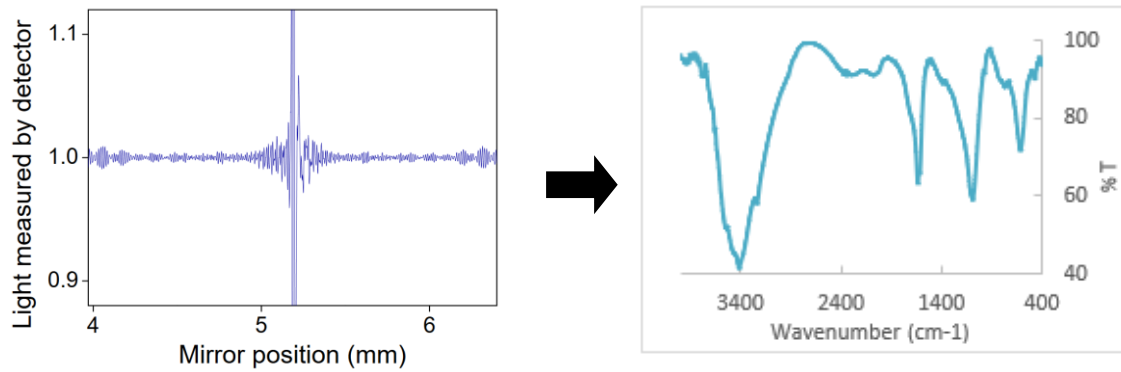


Figura 3-6 Procesado de datos mediante transformada de Fourier.

Como vemos en Figura 3-7, y para el caso de un grupo de tres átomos, existen seis modos de vibración, agrupados en dos tipos según si cambia el ángulo del enlace o no, en los que no cambia el ángulo están las vibraciones de tensión, que pueden ser simétricas y asimétricas. Por otro lado, tenemos las vibraciones de flexión, que pueden ser de cuatro tipos; balanceo en el plano, tijereteo en el plano, aleteo fuera del plano y torsión fuera del plano. [19]

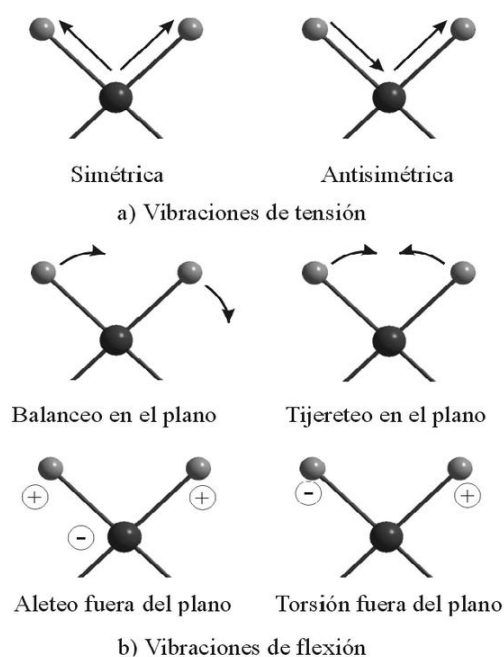


Figura 3-7 Tipos de vibraciones moleculares. El símbolo “+” indica un movimiento desde la página hacia el lector.

Las moléculas absorben las frecuencias que son características de su estructura. Estas absorciones ocurren en frecuencias de resonancia, es decir, la frecuencia de la radiación absorbida coincide con la frecuencia de vibración. Esta frecuencia de resonancia está relacionada con la fuerza del enlace y la masa de los átomos en cada extremo del enlace, por lo tanto, la frecuencia de las vibraciones está asociada con un modo de movimiento normal particular y un tipo de enlace particular, pudiendo así, elaborar tablas de correlaciones en espectroscopia infrarroja dónde comparar los resultados.

3.2.5. XRD (X-Ray Diffraction) Mediciones realizadas por la Lebanese University, Hadat Campus con un difractómetro de rayos X marca Bruker K8 Advance AXS GMBH

Los rayos X son radiación electromagnética de longitud de onda muy corta. La unidad de medida en la región de los rayos X es el angstrom (\AA), igual a 10^{-10} m y los rayos usados en difracción tienen longitudes de onda en el rango de 0.5 a 2.5 \AA .

Recordemos que un átomo se puede representar como un núcleo rodeado de electrones en las capas electrónicas K, L, M, N, O, P y Q. En la difracción de rayos X, si uno de los electrones que bombardean la muestra tiene suficiente energía para arrancar un electrón de la capa K, este átomo queda en un estado excitado de alta energía, inmediatamente un electrón de un nivel superior caerá para rellenar ese hueco emitiendo energía en el proceso.

Algunos de los fotones del haz de rayos X incidente son desviados sin pérdida de energía, constituyendo la radiación dispersada exactamente con la misma longitud de onda (λ) que la radiación incidente, ésta es la que origina el fenómeno de la difracción. Los átomos dispersan la radiación incidente en todas direcciones, y en algunas de estas los rayos dispersados estarán completamente en fase y por tanto se refuerzan mutuamente para formar rayos difractados cumpliendo con la ecuación (3-4).

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (3-4)$$

Esta relación se conoce como Ley de Bragg y establece la condición esencial para que ocurra la difracción.

En la Figura 3-8 se representa la Ley de Bragg en un solo plano.

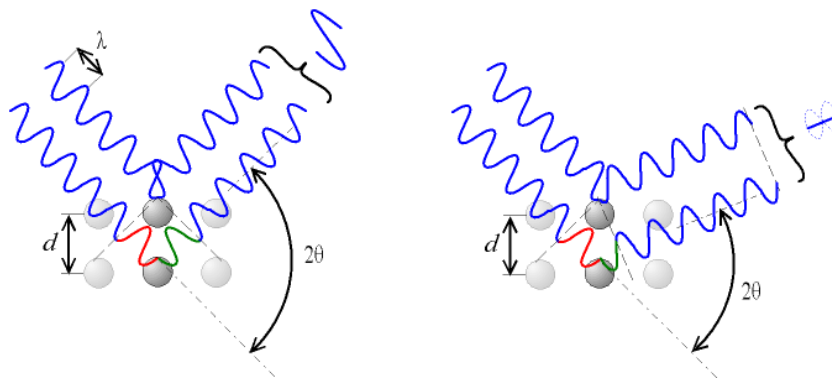


Figura 3-8 Diagrama representativo de la Ley de Bragg. a la izquierda las ondas emergentes están en fase y se observa difracción a un ángulo 2θ respecto al haz incidente. A la derecha la Ley de Bragg no se cumple, las ondas emergentes están desfasadas y no observa difracción.

El efecto neto de interferencia entre los rayos dispersados por todos los electrones en el átomo origina un descenso gradual en la intensidad dispersada al aumentar el ángulo 2θ . En la Figura 3-9 se muestra un diagrama del funcionamiento de un difractómetro de rayos X.

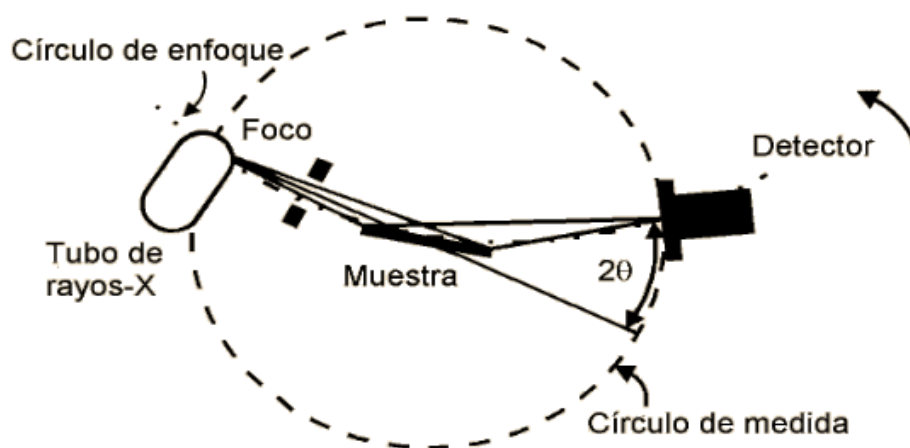


Figura 3-9 Diagrama del funcionamiento de un difractómetro de rayos X con geometría Bragg-Brentano.

Información sustentada en; Difracción de rayos X. Introducción; Pérez P. José, Universidad Politécnica de Cartagena[20].

4. Resultados

En las siguientes figuras se puede observar los distintos pasos del proceso de cristalización:

- Mezcla de componentes en agitación continua.
- Reposo en cámara frigorífica.
- Precipitación de los cristales.
- Filtrado de los cristales en Kitasato
- Secado en estufa de los cristales.



Figura 4-1 Mezcla de componentes en agitación continua.

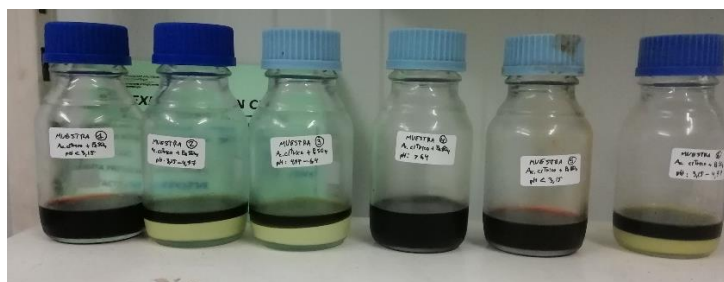


Figura 4-2 Reposo en cámara frigorífica.



Figura 4-3 Precipitación de los cristales.



Figura 4-4 Filtrado de los cristales en Kitasato.



Figura 4-5 Secado de los cristales.

En el caso del estudio de los quelados de citrato de hierro no ha sido posible su cristalización a un pH que no estuviera por debajo de 3,15 (primer pK del ácido cítrico). Como se puede observar en la Figura 4-6 en su intento se obtuvieron disoluciones en dos fases muy bien diferenciadas, una verde y otra marrón muy oscuro sin conseguir la cristalización.

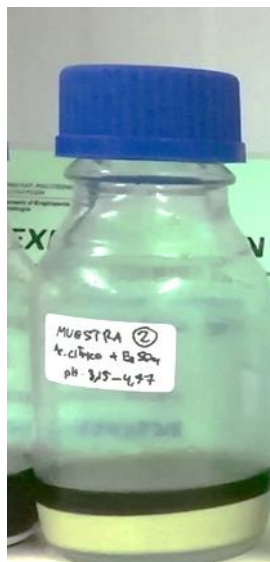


Figura 4-6 Fotografía tomada a dos muestras con pH superiores a 3,15.

En el caso de la quelación del citrato de zinc tampoco se pudo llegar a su cristalización, quedándose todo el sólido en disolución.

El proceso de cristalización duró entre 1 y 2 semanas para todos los cristales excepto la del ácido cítrico, el cual permaneció en cámara frigorífica 3 meses, tras los cuales sí se apreció la formación de cristales.

Cabe mencionar que la sal de sulfato de hierro heptahidratado tenía un color rojizo y húmedo, tal y como se muestra en la Figura 4-7, la cual difiere de su descripción en la bibliografía, que la describen como cristales azul verdoso [21].



Figura 4-7 Fotografía tomada del $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ usado para la preparación de los cristales.

4.1. Propiedades macroscópicas

4.1.1. Color

Pese a que no se ha podido aportar datos cuantitativos con ayuda de un colorímetro, en todos los cristales con el catión hierro se pueden observar a simple vista colores verdosos con formaciones marrones por todo el cristal.

En el Figura 4-8 Es posible observar estas coloraciones para los cristales obtenidos a partir de sulfato de hierro.

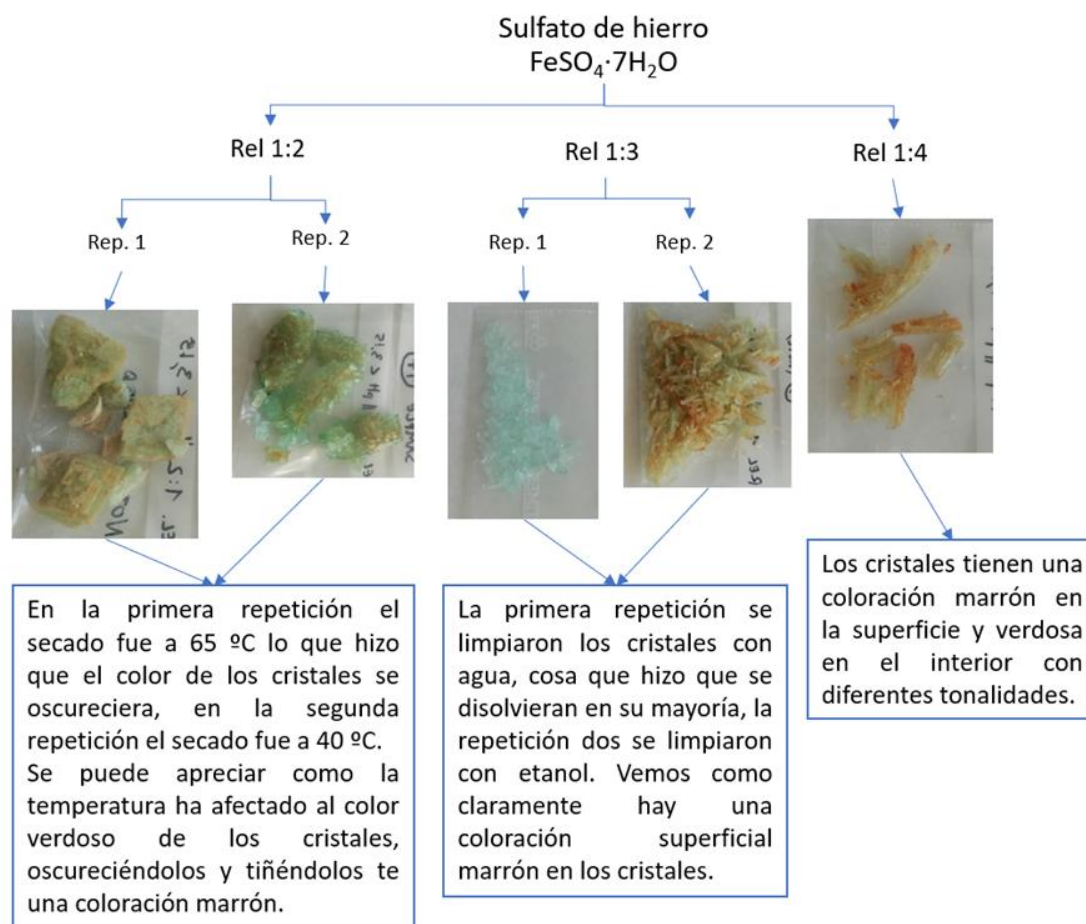


Figura 4-8 Esquema fotográfico e interpretativo de los cristales provenientes del sulfato de hierro.

En referencia a los cristales obtenidos de la sal de Mohr como fuente de hierro y a los de sulfato de cobre, en la Figura 4-9 podemos observar sus características.

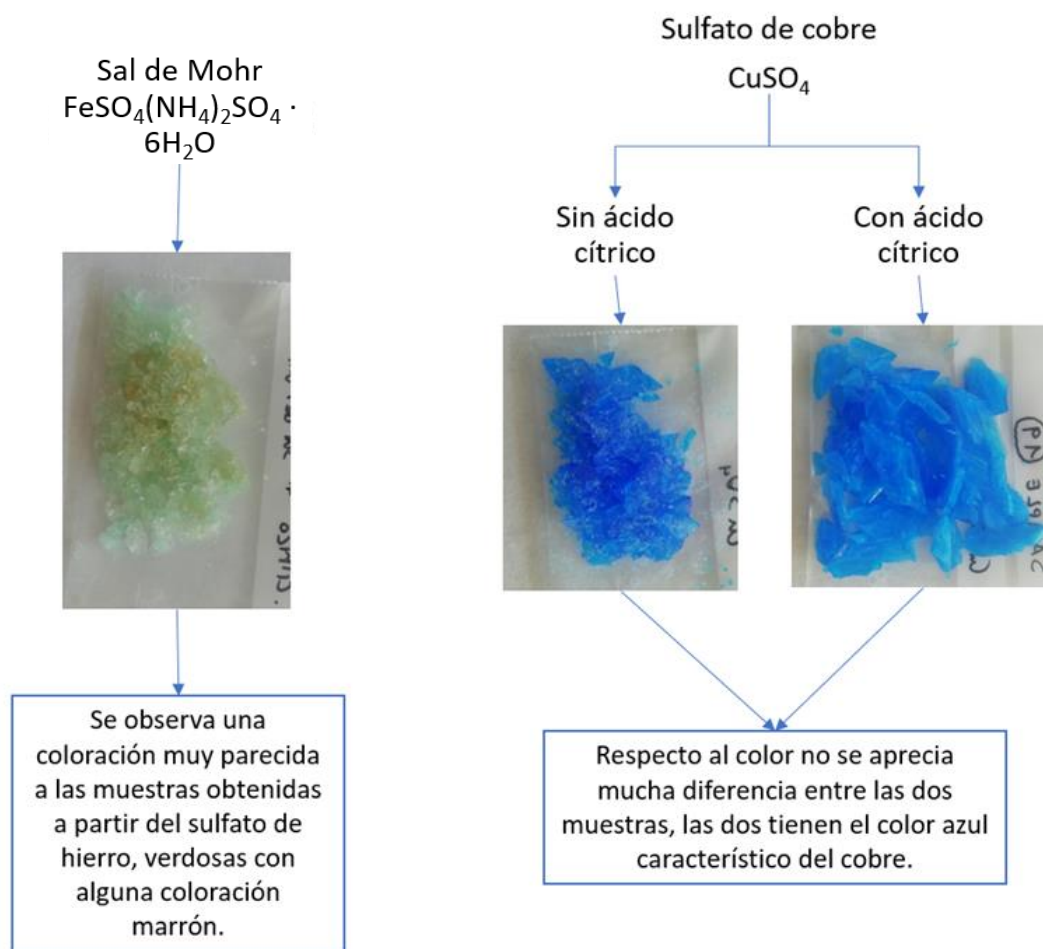


Figura 4-9 Esquema fotográfico e interpretativo de los cristales provenientes de la sal de Mohr y del sulfato de cobre.

4.1.2. Tamaño

A continuación, en la Figura 4-10 se puede observar un ejemplo de la metodología usada en la medición de los cristales. Se midió un cristal que fuera representativo de cada muestra, ya que las muestras presentaron una cantidad de cristales de 5 a 40.

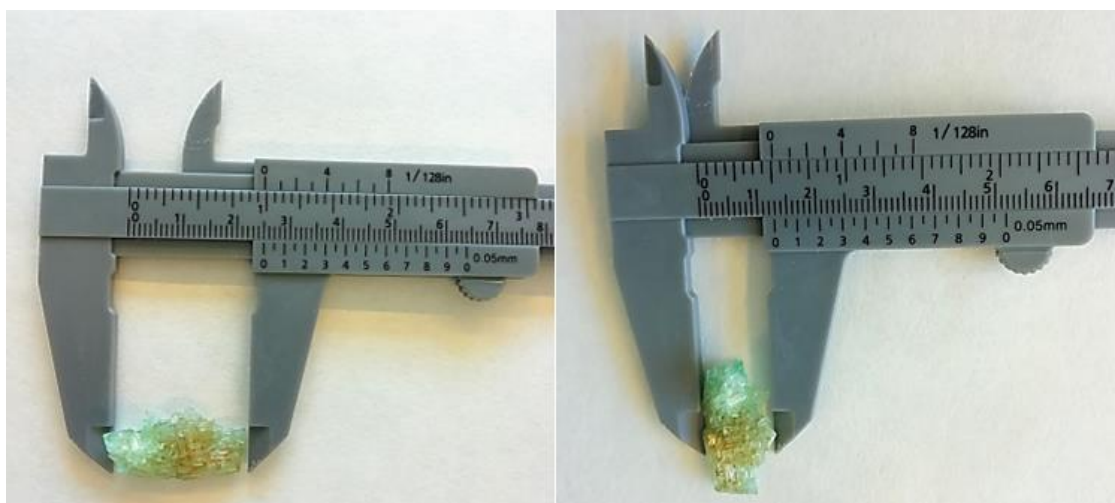


Figura 4-10 Fotografía del cristal de citrato de hierro con relación molar 1:2 proveniente del sulfato de hierro.

En la Tabla 4-1 se puede ver un resumen de las distintas medidas obtenidas.

Tabla 4-1 Resumen de las medidas realizadas con un pie de rey de los diferentes cristales.

Catión	Fuente del catión	Rel. molar	Largo (cm)	Ancho (cm)	L x A (cm ²)
Fe^{+2}	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1:2	2,5	1,3	3,25
		1:3	2,2	0,9	1,98
		1:4	1,7	0,6	1,02
	$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	1:5	0,9	1,0	0,90
Cu^{+2}	$CuSO_4$	1:2	3,5	2,6	9,1
		Sin ác. cítrico	0,8	0,8	0,64

Se puede ver que los cristales de quelado de hierro son más grandes en la relación molar 1:2, disminuyendo a medida que aumentamos esta relación (disminuimos la cantidad aportada de hierro).

En cuanto al cobre, es notable una clara diferencia de tamaños entre los cristales obtenidos aportando ácido cítrico, siendo estos mucho más grandes que la cristalización del sulfato de cobre solo.

4.1.3. Fragilidad

En cuanto a la resistencia mecánica de los cristales, no ha sido posible medir ninguna de las magnitudes relacionadas con esta (como la dureza o la resistencia a la compresión) pero cabe mencionar la fragilidad, entendiendo ésta como la facilidad del material a fracturarse.

Al igual que el color por falta de un colorímetro, no se puede dar una respuesta cuantitativa a esta magnitud ya que no fue posible la realización de ninguna prueba con texturómetro o equipo similar, pero sí una pequeña comparación entre las distintas muestras puesto que mientras se trabajó con ellas se notó que algunos cristales se rompían con muchísima facilidad al manipularlos mientras que otros conservaban su forma.

En el caso de los cristales de citrato de hierro se advirtió que a mayor concentración de hierro (en la estequiometría 1:2) los cristales no se rompían con facilidad, mientras que al reducirla los cristales se rompían muy fácil al manipularlos.

En el caso de los cristales de citrato de cobre se percibió que la muestra que no llevaba ácido cítrico (es decir, el cristal no era de citrato de cobre sino solo de cobre) era mucho más frágil y se rompían al manipularlos.

4.1.4. Peso y rendimiento del proceso de cristalización

En la Tabla 4-2 se puede observar el peso experimental de cada componente y el peso final de los cristales ya secados.

Para calcular el rendimiento se ha usado la ecuación (4-1).

$$\frac{\text{Peso del cristal}}{\text{Peso de la sal}} \cdot 100 = \eta \quad (4-1)$$

Tabla 4-2 Resumen de los pesos experimentales de los componentes y los cristales obtenidos junto con el rendimiento calculado.

Catión	Fuente del catión	Relación molar	Repetición	Ác. cítrico (g)	pH	Sal de inicio (g)	Cristal (g)	η medio (%)
Fe^{+2}	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1:2	Rep 1	19,9977	1,67	14,4468	5,3998	37,10
			Rep 2	20,0336	0,17	14,4618	5,3245	
		1:3	Rep 1 ¹	20,1756	0	9,6504	0,5121	36,65²
			Rep 2	20,0208	0	9,6318	3,5300	
		1:4	-	19,9977	0	7,2568	1,0360	14,28
		1:5	-	20,0185	0,34	8,0093	3,1017	38,76
Cu^{+2}	$CuSO_4$	1:2	-	20,0392	0	8,0104	5,9538	74,33
		Sin ác.	-	0	2,92	9,0101	3,7367	41,47

¹Se disolvieron la mayoría de los cristales por un error en la limpieza de estos.

²No se tuvo en cuenta el rendimiento de la repetición 1 para el cálculo de la media.

Al comparar los rendimientos del hierro se observan similitudes entre los resultados obtenidos, con las únicas excepciones de la repetición 1 de la relación molar 1:3, que como se anotó



anteriormente fue por un error en la limpieza de los cristales, y la relación molar 1:5 que sí presenta un valor más alto que el resto.

Fijándose en el rendimiento del cobre vemos una clara ventaja en su obtención con ácido cítrico con un rendimiento de 74,33 %.

4.2. Punto de fusión

El punto de fusión se determinó usando el aparato de la marca *Stuart – melting point SMP10*, que podemos observar en la Figura 4-11.



Figura 4-11 Aparato usado para la medición del punto de fusión.

Un ejemplo de la observación realizada se muestra en la Figura 4-12. El aparato tiene un rango de temperaturas de entre 0 °C y 300 °C, cosa que ha sido limitante a la hora de la caracterización del punto de fusión de las muestras.

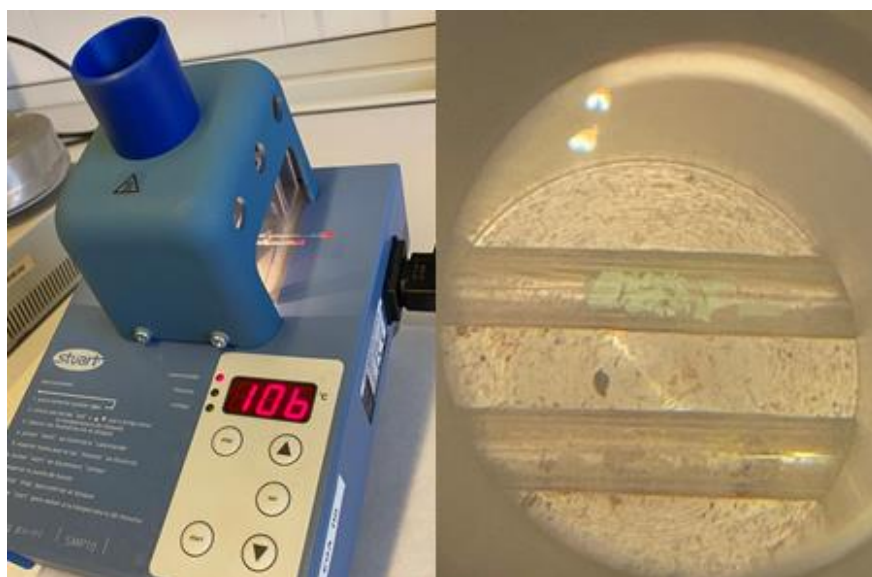


Figura 4-12 Fotografías tomadas del proceso de obtención de los puntos de fusión.

A continuación, en la Tabla 4-3 observamos el resultado de los puntos de fusión:

Tabla 4-3 Resultados de la temperatura de fusión de los diferentes cristales.

Catión	Fuente del catión	Relación molar	Temperatura de fusión (°C)
Fe^{+2}	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1:2	> 300
		1:3	> 300
		1:4	> 300
	$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	1:5	> 300
Cu^{+2}	$CuSO_4$	1:2	> 300
		Sin ác. cítrico	112
-	Ácido cítrico	-	148

Como se ha mencionado antes, se puede observar que para alguna de las muestras se alcanzó el límite de 300 °C.

El punto de fusión del sulfato de hierro es de alrededor a 60 °C, el del sulfato de cobre es de 560 °C [22] y el del ácido cítrico es de 153 °C [23].

Haciendo una comparación entre las temperaturas de fusión obtenidas y las temperaturas de fusión de referencia se ven similitudes en el ácido cítrico cuya diferencia es solamente de 5 °C. En cuanto a los quelados obtenidos a partir de sulfato de hierro y sal de Mohr se alcanzó el límite de 300 °C.

Por otro lado, el cristal de sulfato de cobre resultó en una temperatura de fusión de 112 °C, la cual difiere con la bibliografía, en cuanto al quelado de cobre también alcanzó la temperatura máxima del aparato usado.

Cabe mencionar que para las muestras de quelado de hierro a partir de sulfato de hierro se observó la presencia de gotas líquidas desde los 60 a los 70 °C, la cual se atribuyó a posible humedad que pudiera tener el cristal.

4.3. Espectros FTIR

En la Tabla 4-4 presentada a continuación, se puede ver de forma esquematizada los picos más importantes y sus características de todos los cristales obtenidos.

Tabla 4-4 Tabla con los picos más importantes de las diferentes muestras y sus características.

Muestra	Picos (cm ⁻¹)	Comentario y características del pico	
Quelado de Fe	489	De 85 a 95 % de T, amplio.	-
	620	De 55 a 85 % de T, muy agudo.	-
	720	De 75 a 95 % de T, pequeño.	Doblamiento C-H
	971	De 85 a 95 % de T, pequeño y agudo.	-
	1091	De 35 a 70 % de T, muy agudo.	Estiramiento C-O-C
	1428	70 % de T Solo presente en la sal de Mohr.	Doblamiento O-H
	1608-1637	De 55 a 65 % de T, doble pico agudo.	Estiramiento C=O
	3226	De 45 a 65 % de T, amplio.	Estiramiento C-H
	3400	De 30 a 50 % de T, muy amplio y grande.	Estiramiento H-O-H
Quelado de Cu	484	95 % de T, amplio y pequeño.	-
	620	80 % de T, agudo y grande.	-
	1091	80 % de T, amplio y grande.	Estiramiento C-O-C
	1624-1629	75 % de T, doble pico muy agudo.	Estiramiento C=O
	2852-2926	95 % de T, doble pico pequeño y amplio.	Estiramiento C-H
	3400	60 % de T, muy amplio y grande.	Estiramiento H-O-H
Ác. cítrico	593-632	85 % de T doble pico agudo.	-
	1428	80 % de T, doble pico agudo.	Doblamiento O-H
	1637-1725	60 % de T, doble pico grande y agudo.	Estiramiento C=O
	2840-2930	80 % de T, doble pico pequeño y amplio.	Estiramiento C-H
	3226	65 % de T, pequeño y amplio.	Estiramiento C-H
	3400	50 % de T, muy amplio y grande.	Estiramiento H-O-H
Sulfato de Fe	620	55 % de T, muy agudo	-
	1091	40 % de T, muy agudo.	Estiramiento C-O-C
	1637	50 % de T, muy agudo.	Estiramiento C=O
	3400	20 % de T, muy amplio y grande.	Estiramiento H-O-H
Sulfato de Cu	620	70 % de T, agudo y grande.	-
	980	90% de T, pequeño y amplio.	-
	1091-1145	60 % de T, doble pico amplio y grande.	Estiramiento C-O-C
	1637	65 % de T, doble pico muy agudo.	Estiramiento C=O
	3400	40 % de T, muy amplio y grande.	Estiramiento H-O-H

Referencias: [24] [25].



4.3.1. Quelación citrato – hierro

En la comparación de las gráficas de los espectros FTIR para los quelados de relación molar 1:2 y 1:3 se ha usado solo la repetición 2 (Rep 2) para no sobrecargar las gráficas de datos y poder observar mejor las diferencias entre las diferentes series. Se ha tenido en cuenta solamente la repetición 2 ya que sus espectros infrarrojos son muy parecidos, tal y como se puede observar en la Figura 4-13 y la Figura 4-14.

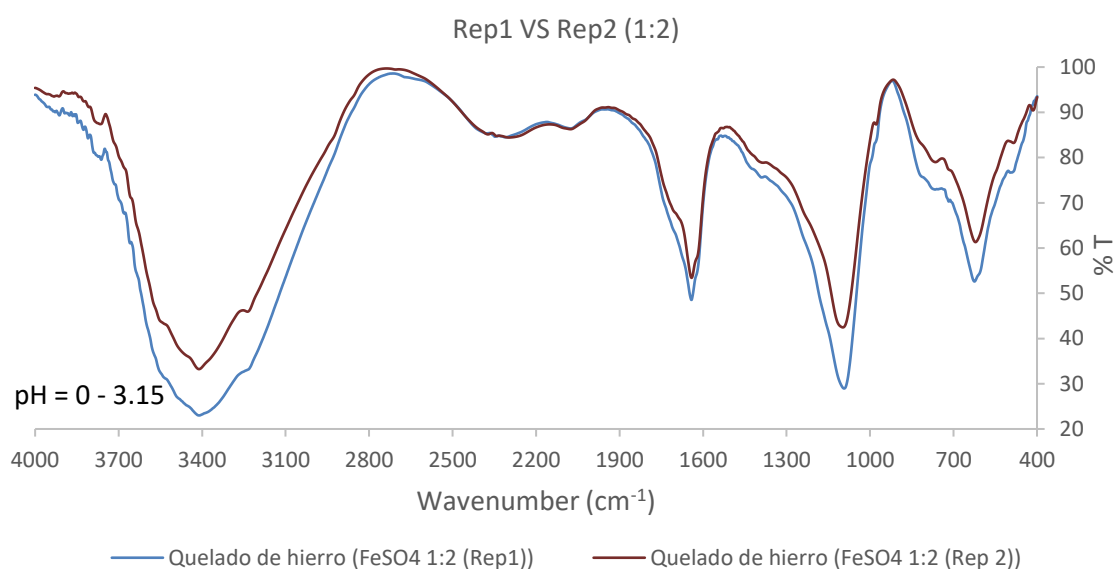


Figura 4-13 Espectro FTIR comparando las repeticiones 1 y 2 del quelado de citrato de hierro con la relación molar 1:2.

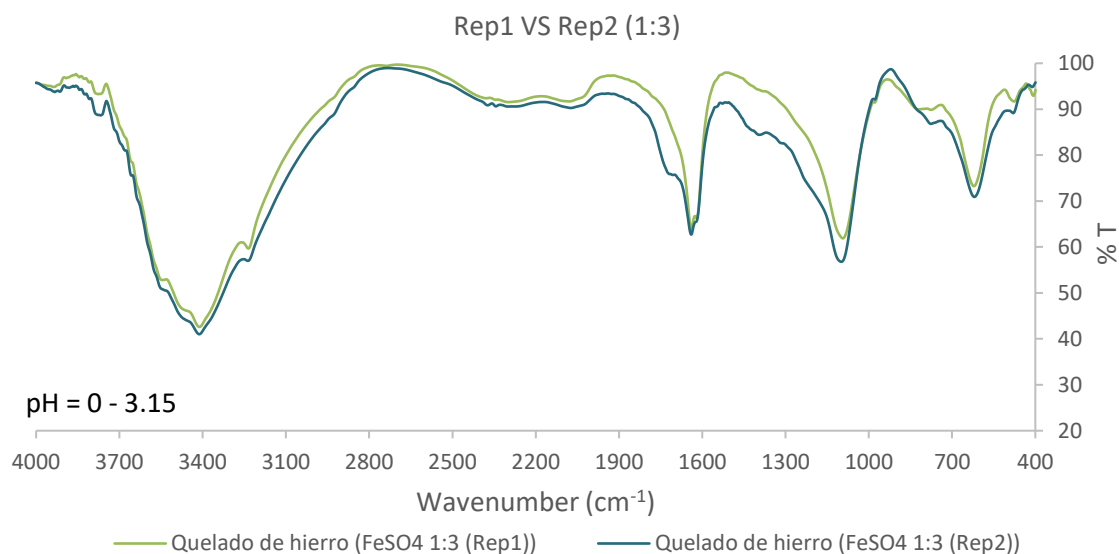


Figura 4-14 Espectro FTIR comparando las repeticiones 1 y 2 del quelado de citrato de hierro con la relación molar 1:3.

En la Figura 4-15 y Figura 4-16 se observan las diferencias entre los espectros de ácido cítrico y de quelado de hierro obtenidos, el más significativo lo encontramos a la longitud de onda de 1725 cm^{-1} , donde el ácido cítrico presenta un pico típico del estiramiento del grupo carboxílico $\text{C}=\text{O}$ [24], en los quelados hay una ausencia de este pico. A 1637 cm^{-1} tenemos un pico tanto en el ácido cítrico como en los quelados, a esta longitud de onda absorbe el doble enlace $\text{C}=\text{O}$ [24] por lo que se puede intuir que el hierro (o los hierros) no están enlazados con todos los grupos carboxílicos del ácido cítrico. En 3400 cm^{-1} también se observan similitudes ya que aquí absorbe la vibración de los estiramientos $\text{O}-\text{H}$ [24], es muy probable que haya moléculas de agua que intervengan en la estabilidad de estas moléculas.

La siguiente diferencia lo encontramos a 1428 cm^{-1} , está presente en el ácido cítrico en menor medida y en el quelado usando la sal de Mohr, éste se debe al doblamiento del enlace $\text{O}-\text{H}$ [25] por lo que puede pertenecer tanto a los grupos carboxílicos sin asociar con el hierro como con las moléculas de agua que hayan podido quedar en la muestra o que hagan parte de la estructura.

La mayor diferencia en intensidad al comparar los compuestos quelados con el ácido cítrico se encuentra a 1091 cm^{-1} , en un rango de longitudes de onda en el que absorbe la luz infrarroja los

estiramientos simétrico y asimétrico típicos de los ésteres C-O-C según las dos tablas consultadas con anterioridad.

La otra gran diferencia en los espectros es a 620 cm^{-1} , donde se puede ver un pico muy intenso en los quelados. A esta longitud de onda no se encuentra caracterizado ningún enlace, pero la bibliografía sugiere que junto con el pico anterior a 1091 cm^{-1} , estos puedan ser característicos del grupo sulfato [26].

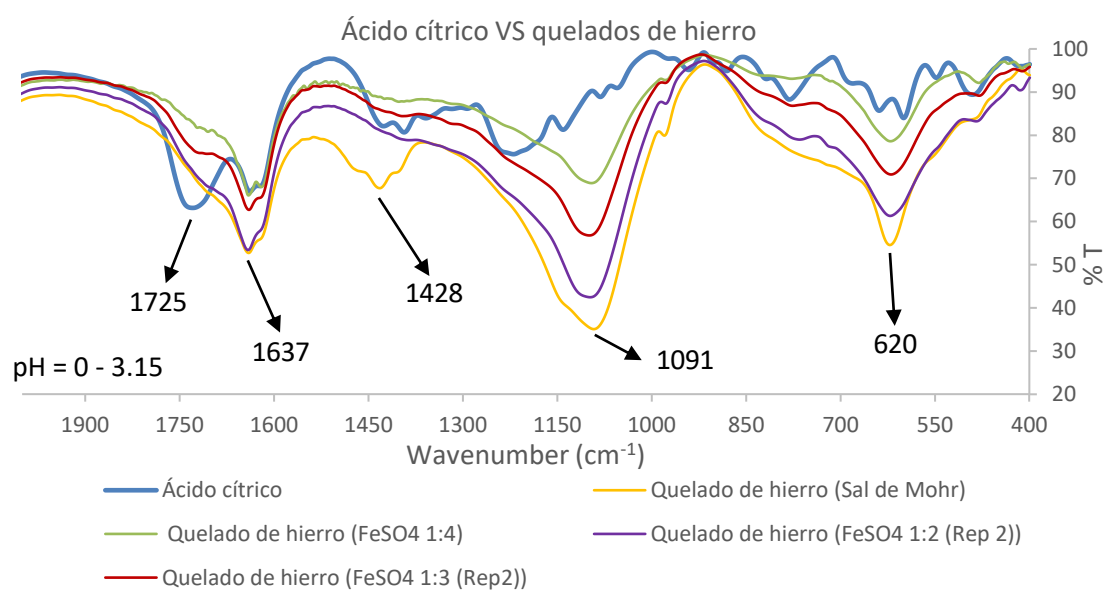


Figura 4-15 Espectro FTIR de 400 a 2000 cm^{-1} comparando ácido cítrico con los diferentes quelados de hierro obtenidos.

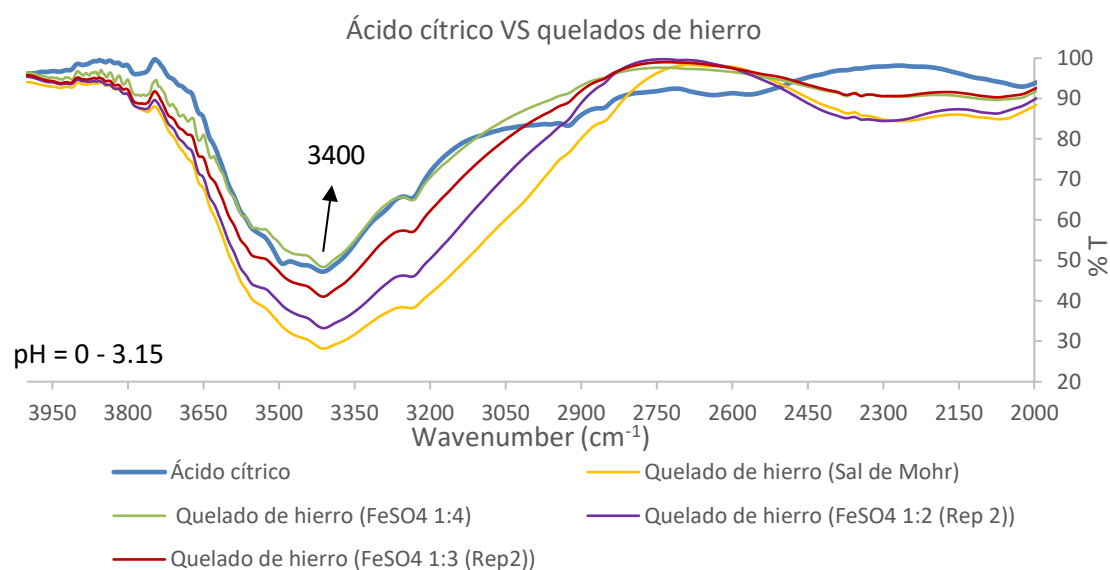


Figura 4-16 Espectro FTIR de 2000 a 4000 cm^{-1} comparando ácido cítrico con los diferentes quelados de hierro obtenidos.

A continuación, en la Figura 4-18 y Figura 4-19 se pueden observar las diferencias entre los espectros de los quelados de hierro y el espectro del sulfato de hierro heptahidratado. Se ha eliminado la serie del quelado formado a partir de Sal de Mohr para una mejor visualización de los picos y poder entrar en más detalle. Vemos que el espectro infrarrojo presenta los mismos grandes picos mencionados en las gráficas anteriores con un cambio en su intensidad, pero con unas pequeñas diferencias que se han marcado en círculos y dos de ellas se han ampliado para facilitar su visualización. Se puede ver como hay cinco zonas en las que presentan diferencias los espectros de los quelados y el del sulfato de hierro.

Cabe destacar que en cuanto a la transmitancia (%T) las gráficas siguen un patrón que se repite en casi cualquier longitud de onda, son las diferencias correspondientes a la relación molar usada. Recordemos que como se muestra en la Figura 3-4, hemos usado tres relaciones molares, y si las comparamos con los espectros vemos que a mayor cantidad de ác. cítrico (relación molar 1:4), mayor transmitancia, es decir, menor absorbancia de los rayos infrarrojos. Su esquematización se puede apreciar mejor en la Figura 4-17.

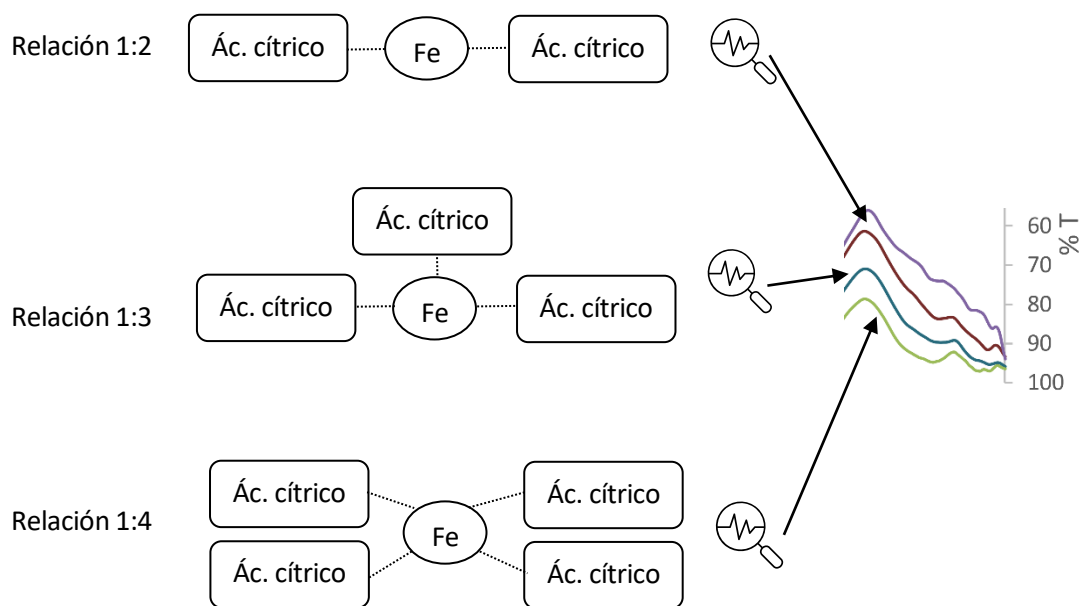


Figura 4-17 Esquema de las posibles relaciones molares propuestas en el catión hierro comparadas con las transmitancias de los espectros FTIR.

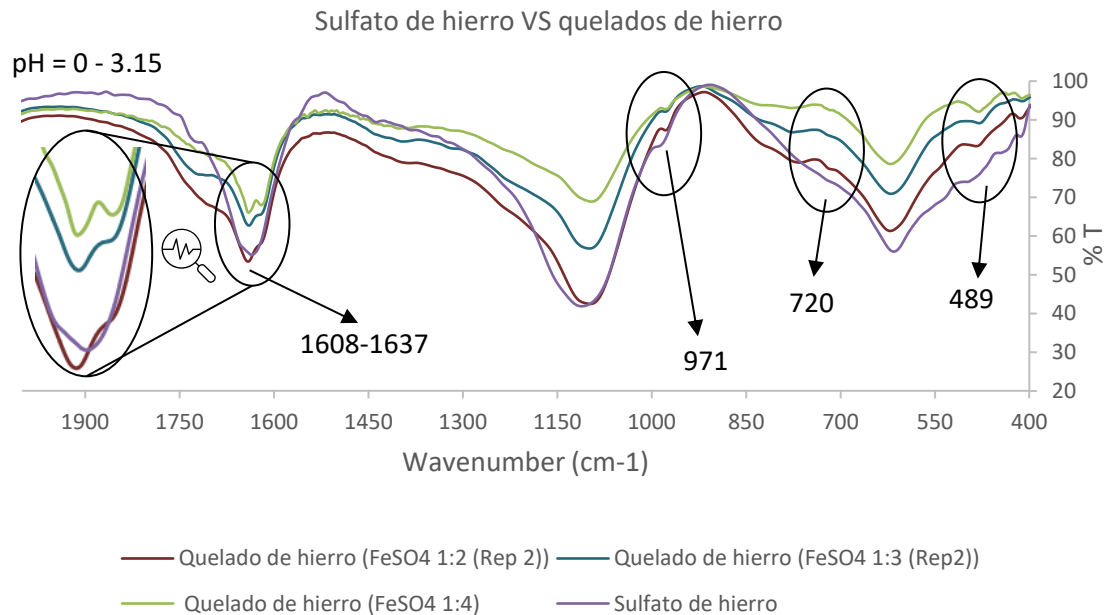


Figura 4-18 Espectro FTIR de 400 a 2000 cm^{-1} comparando los diferentes quelados de hierro obtenidos y el sulfato de hierro.

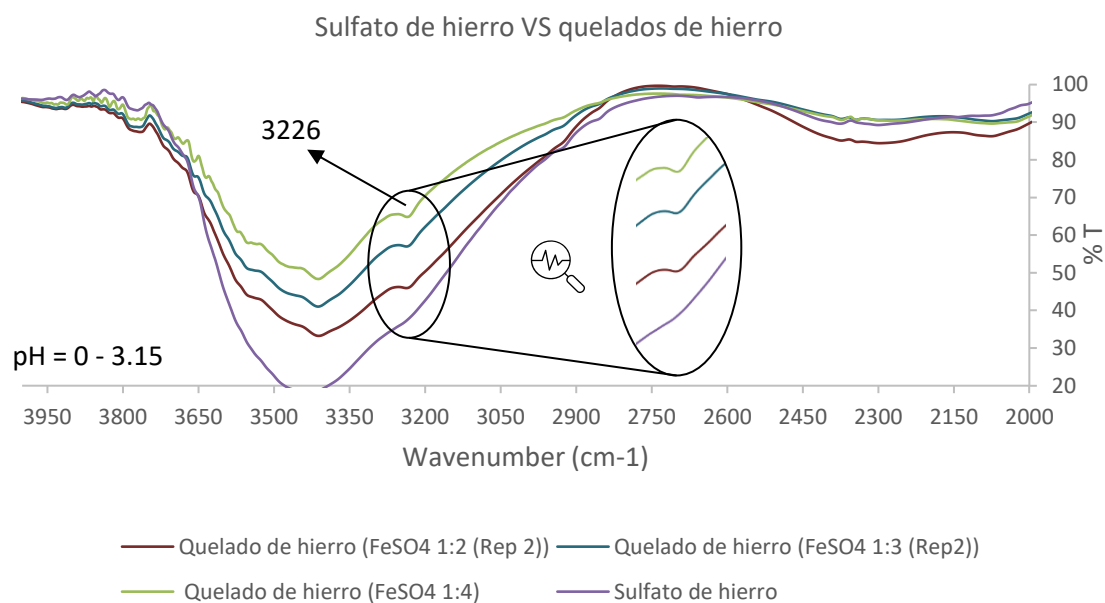


Figura 4-19 Espectro FTIR de 2000 a 4000 cm^{-1} comparando los diferentes quelados de hierro obtenidos y el sulfato de hierro.

4.3.2. Quelación citrato – cobre

En este apartado se comparará el espectro FTIR de ácido cítrico, sulfato de cobre y quelado de cobre, en la Figura 4-20 se pueden observar los tres espectros superpuestos.

Se observan diferencias en las transmitancias de los picos, pero ningún gran pico nuevo, el de 3400 cm^{-1} compartido por los tres compuestos, el de 1725 cm^{-1} típico del ácido cítrico, el de 1637 cm^{-1} , 1091 cm^{-1} y 620 cm^{-1} que aparecen en el sulfato de cobre y el quelado de cobre vistos y mencionados en el apartado anterior.

Al analizar la gráfica al detalle, se aprecian tres sutiles diferencias. La primera se observa en la Figura 4-20, donde se aprecia un pico a 980 cm^{-1} en el caso del sulfato de cobre, que está ausente en el quelado de cobre. Las otras dos diferencias se aprecian en la Figura 4-21, igual que antes vemos un doble pico entre $2852\text{--}2926\text{ cm}^{-1}$ presente en el ácido cítrico y en menor medida en el quelado de cobre, mientras que el sulfato de cobre carece de él. La tercera y última diferencia se puede observar en torno a 3120 cm^{-1} , que para el sulfato de cobre hace un tramo de curva

cóncavo mientras que en el caso del ácido cítrico y el quelado de cobre, tienen el tramo de curva convexo.

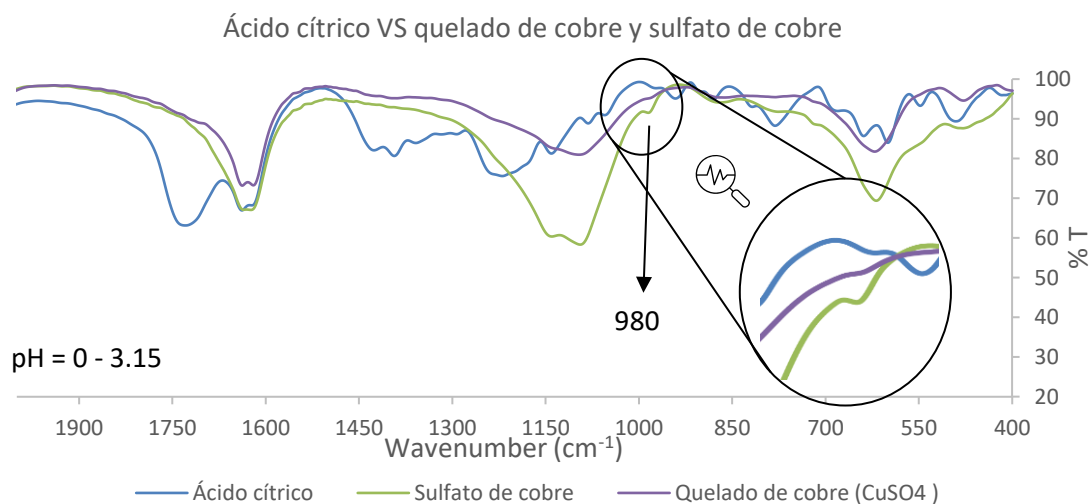


Figura 4-20 Espectro FTIR comparando ácido cítrico con el quelado obtenido de cobre y el sulfato de cobre.

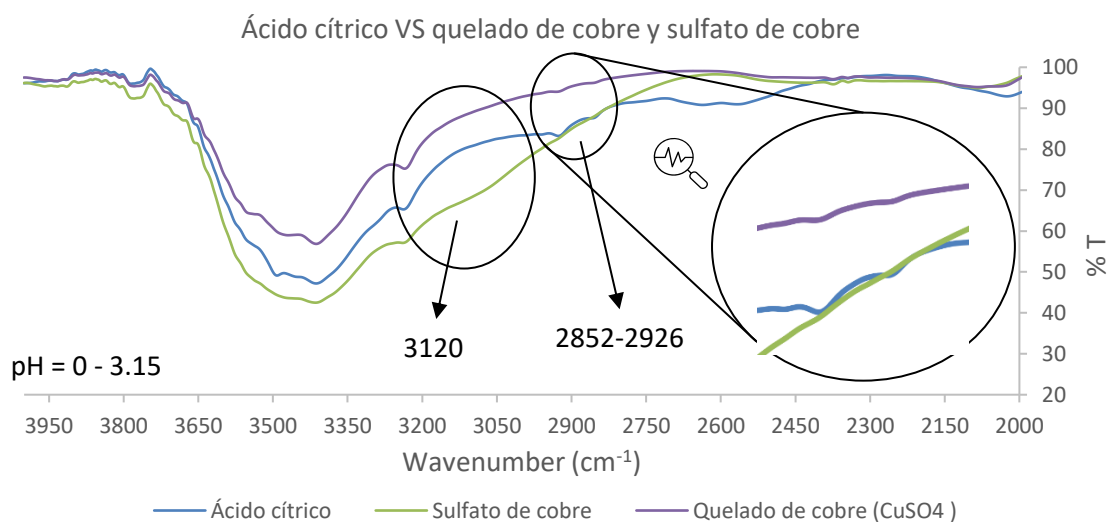


Figura 4-21 Espectro FTIR comparando ácido cítrico con el quelado obtenido de cobre y el sulfato de cobre.

4.4. Espectros XRD

4.4.1. Quelación citrato – hierro

Igual que pasa en el apartado FTIR, para intentar reducir el número de datos se ha comparado en la Figura 4-22 y en la Figura 4-23 las dos repeticiones del quelado con relación molar 1:2 y 1:3. En el caso de la relación molar 1:2 esta vez se optó por quedarse con la repetición 1 (Rep1).

En el caso de la relación molar 1:3 se tendrán en cuenta las dos repeticiones puesto que muestran igual picos, pero en diferentes secciones.

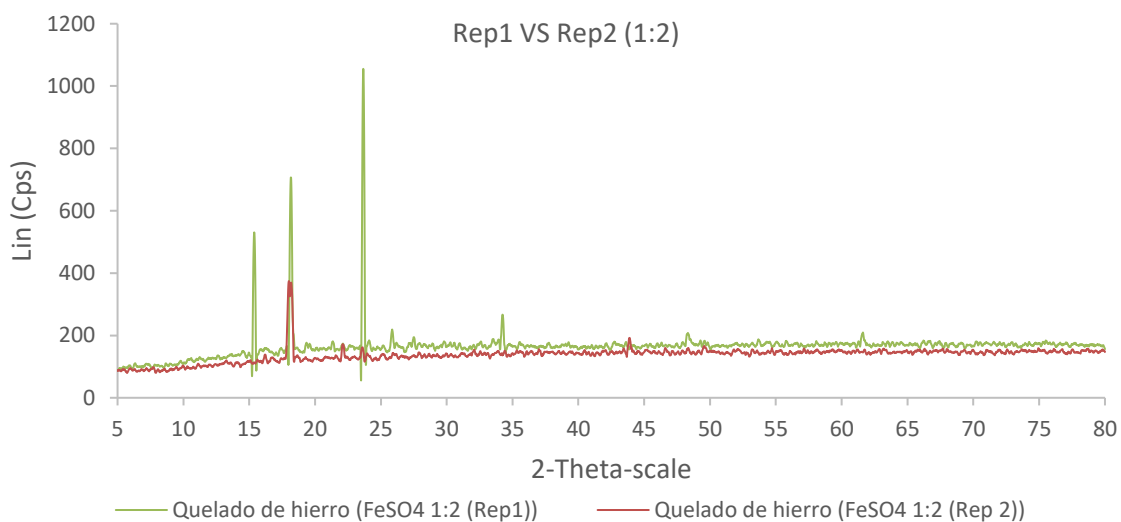


Figura 4-22 Espectro XRD comparando las repeticiones 1 y 2 del quelado de citrato de hierro con la relación molar 1:2.

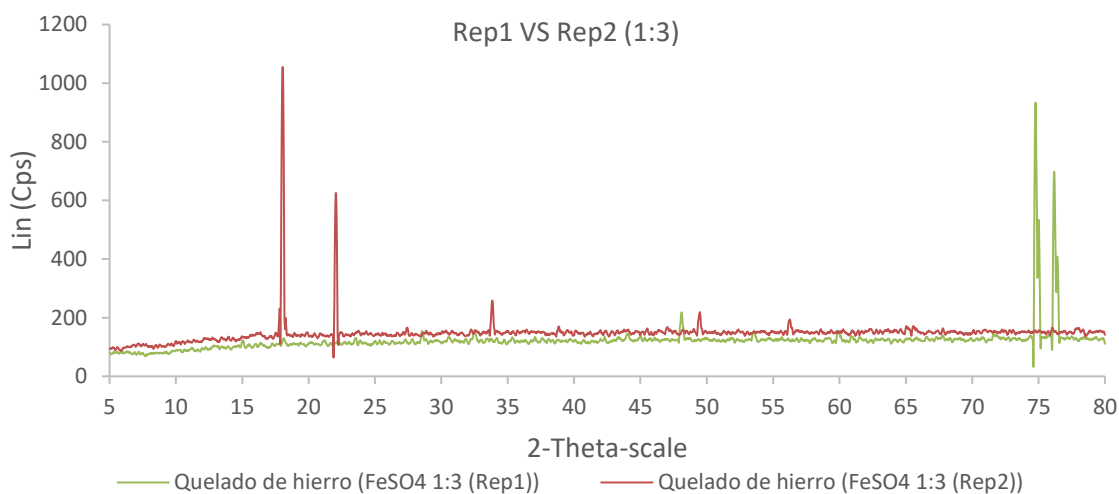


Figura 4-23 Espectro XRD comparando las repeticiones 1 y 2 del quelado de citrato de hierro con la relación molar 1:3.

Como se puede observar en la Figura 4-24, hay múltiples picos, lo cual indica que se han creado múltiples formaciones cristalinas, es decir, diferentes geometrías. Aun así, la gráfica muestra picos más agudos en el ácido cítrico que en los quelados, esto indica una difracción más eficiente de los rayos X en el ácido cítrico, por lo que las moléculas están organizadas dando una estructura de mayor cristalinidad [27][28].

A pesar de las pequeñas diferencias, todos los cristales dieron picos agudos en el rango de $2-\theta = 15^\circ$ a $2-\theta = 25^\circ$ excepto la repetición 1 del quelado con relación molar 1:3, cuyos picos agudos se dieron en torno a $2-\theta = 75^\circ$.

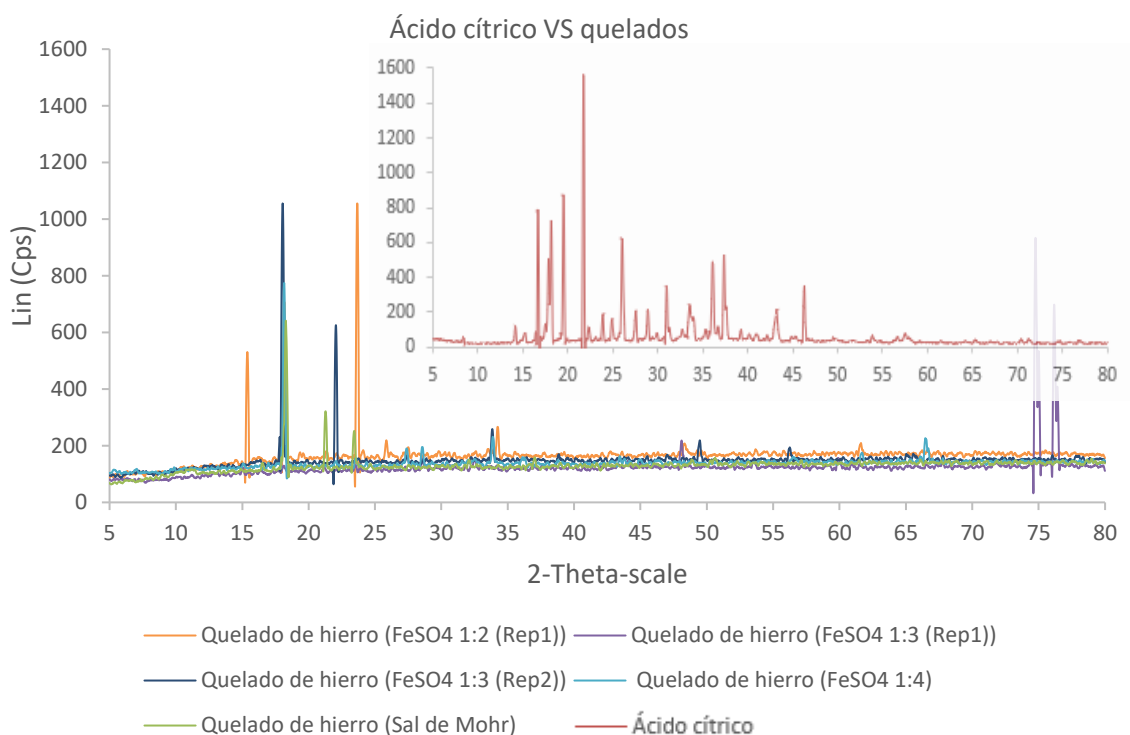


Figura 4-24 Espectro XRD de ácido cítrico y los diferentes quelados de hierro obtenidos.

4.4.2. Quelación citrato – cobre

En la Figura 4-25 se observan los espectros del ácido cítrico, el sulfato de cobre y el quelado de cobre. Se puede apreciar como el ácido cítrico reúne sus picos en el rango de $2-\theta = 15^\circ$ a $2-\theta = 25^\circ$ mientras que el sulfato de cobre y el quelado de cobre tienen picos dispares desde los $2-\theta = 15^\circ$ hasta los $2-\theta = 75^\circ$. Tanto el sulfato de cobre como el quelado de cobre tienen picos similares a $2-\theta = 18^\circ$, $2-\theta = 22^\circ$, $2-\theta = 24^\circ$ y $2-\theta = 40^\circ$. En cuanto a sus diferencias se pueden observar por todo el espectro, siendo el pico más alto a $2-\theta = 72^\circ$, llegando a los 1000 cps, solo perteneciente a la muestra de quelado de cobre. En cuanto a la intensidad de los picos vemos que difícilmente llegan a 900 cps mientras que el ácido cítrico llega a los 1600 cps, lo que sugiere una red menos cristalina que en el ácido cítrico.

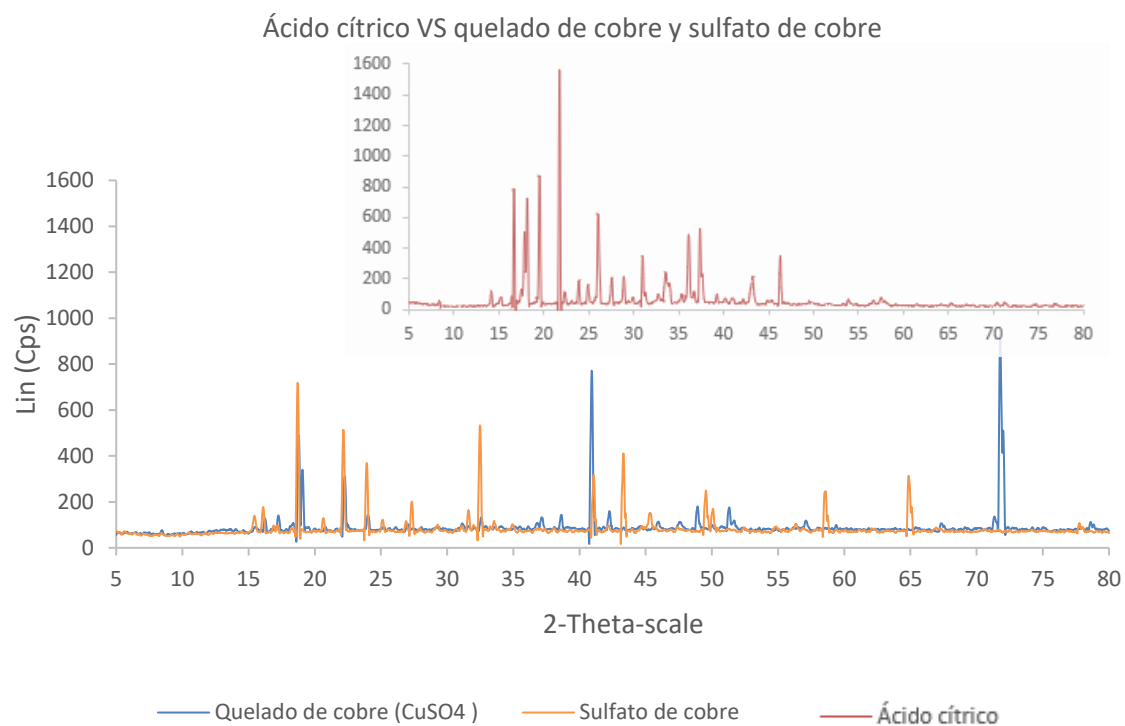


Figura 4-25 Espectro XRD comparando ácido cítrico con el quelado obtenido de cobre y el sulfato de cobre.

5. Discusión

Al igual que en el trabajo de Clemente Villalba, J. (2017) vemos que sólo ha sido posible la cristalización de los quelados de hierro a un pH ácido, por debajo de 3,15, ya que al intentarlo a pH por encima de éste se formaban las dos fases observables en la Figura 4-6, pero no se observó la formación de cristales. En la publicación de EFSA Journal (EFSA, 2006) [29] se indica que el bis-glicinato ferroso es inestable a pH básico debido a la rotura de los enlaces quelados, cosa que podría pasar en el caso del quelado de ácido cítrico también, y explicaría la no obtención de estos cristales por encima de dicho pH.

En referencia a los distintos cationes de los que se quería obtener quelado, no se pudo cristalizar quelados de zinc, en contraposición encontramos que, en el trabajo de Clemente Villalba, J. (2017) sí se obtuvieron, con la diferencia que en su trabajo se usó $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ como sal de partida.

En cuanto al intento de recristalización de los componentes por separado, solo se pudo recristalizar el ácido cítrico y el sulfato de cobre, en el caso del sulfato de hierro se usó la misma sal heptahidratada de la casa Panreac que aparece en el apartado 3.1.1 Reactivos para obtener su espectro FTIR. Cabe mencionar que mientras todos los compuestos tardaron en cristalizar de 1 a 2 semanas, el ácido cítrico tardó de 12 a 15 semanas (unos 3 meses) cosa que se ha tenido en cuenta a la hora del análisis de los espectros FTIR, ya que al tardar más tiempo en cristalizar que los quelados, se supone que los quelados no tienen restos de ácido cítrico ya cristalizados (sin conformar el quelado).

En el estudio de Yunarti, R. T. (2013) [30] se incorporó al proceso de cristalización una atmósfera de nitrógeno, según Guðmundsson, A., Schlipköter, K. E., & Bäckvall, J. E. (2020) [31] un grupo alcohol puede catalizar una reacción de oxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} transfiriendo un electrón del grupo alcohol al oxígeno molecular. Esta información junto al aspecto que tenía la sal de sulfato de hierro heptahidratada tal y como se observó en la Figura 4-7, sugiere que el hierro usado pudo estar oxidado a Fe^{+3} .

Hierro



En el análisis de los espectros FTIR del trabajo de Clemente Vilalba, J. (2017), se concluye que el catión metálico Fe^{2+} interviene únicamente con los oxígenos del grupo carboxilo, y también que éste interacciona con tres moléculas glicina, por lo que una comparación con el ácido cítrico, aunque plausible, es complicada. En el supuesto general que el Fe^{2+} interaccione con tres grupos carboxilos, podría hacerlo con los tres grupos que tiene una sola molécula de ácido cítrico, o bien solo con un grupo de tres moléculas de ácido, o bien con dos grupos carboxilos de un ácido cítrico y con solo uno de otra molécula de ácido.

A todas estas posibilidades se le suma que posiblemente el Fe^{+2} se oxidó a Fe^{+3} , por lo que el siguiente análisis y discusión sobre los espectros FTIR obtenidos, ha sido una discusión más bien comparativa entre las diferentes muestras y técnicas usadas.

Según los espectros FTIR obtenidos de las diferentes muestras de quelado y sales de hierro, y después de contrastarlos con los espectros FTIR de la SpectraBase Bio-Raid (s.f.) [32], se han visto semejanzas en los picos más intensos, como a 620 cm^{-1} , 1091 cm^{-1} , 1637 cm^{-1} y 3400 cm^{-1} , pero al entrar más en detalle en el análisis y comparar los quelados con la sal de sulfato de hierro, se ven diferencias considerables a 489 cm^{-1} , 720 cm^{-1} , 971 cm^{-1} y $1608\text{-}1637\text{ cm}^{-1}$, lo cual sugiere que las muestras obtenidas de la quelación no son cristales de sulfato de hierro. Por otro lado, también podemos afirmar que los espectros son muy diferentes del espectro del ácido cítrico, lo que respalda la hipótesis de que los resultados podrían ser quelados de ácido cítrico con hierro como se buscaba. En cuanto al cristal obtenido a partir de la sal de Mohr, la diferencia en el espectro con el pico en 1428 cm^{-1} concuerda con el espectro de la propia sal de Mohr [33].

El punto de fusión, por lo contrario, nos da información contradictoria. Si se tiene en cuenta que esa humedad observada a los $60 - 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ era en realidad el punto de fusión del cristal, esto concuerda con el punto de fusión del sulfato de hierro.

A estos dos últimos indicios, el FTIR y el punto de fusión, se les ha sumado el espectro XRD, que como se ha visto con anterioridad muestra múltiples picos dejando en evidencia la cantidad de geometrías existente entre los diferentes planos de reflexión en una misma muestra. Estos resultados junto a las pequeñas variaciones que se han comentado sobre el

espectro FTIR que difieren los quelados con la sal de sulfato de hierro, podría suponer la múltiple formación cristalina tanto de quelados como de sulfatos de hierro.

Respecto a la diferencia que muestran los cristales en tamaño, comparándolos con su estequiometría vemos que a mayor estequiometría (más moléculas de ácido cítrico por molécula de hierro) menor tamaño. No hay una bibliografía que relacione el tamaño de los cristales con la estequiometría del quelado, la cristalización en general es un proceso muy complejo que depende de un número importante de factores que no siempre están bien definidos ni pueden controlarse, aún así, una explicación puede ir orientada al número de enlaces que tengan las moléculas del cristal o cómo de fuertes son estos enlaces.

Pese a los indicios de quelación, como se ha apuntado con anterioridad, el pH es un factor muy importante a la hora de la formación de los quelados, y para concluir definitivamente en una propuesta de estructura del quelado se necesitaría los espectros de la formación de dichos quelados a un pH por encima del valor de pK, para ver la influencia del grupo carboxílico protonado/desprotonado a la unión con el hierro.

Cobre

Por lo que refiere al cobre, aún sin tener tantas muestras como en el caso del hierro, el espectro FTIR muestra diferencias entre el quelado de cobre y el sulfato de cobre, se pueden observar a 980 cm^{-1} , $2852\text{-}2926\text{ cm}^{-1}$ y a 3120 cm^{-1} , además, en los principales picos que comparten las dos muestras, vemos diferencias en la transmitancia de hasta el 30%, cosa que indicaría una mayor presencia de determinados enlaces.

Por lo que refiere al punto de fusión, se obtuvo un valor de $112\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el sulfato de cobre, difiriendo con el bibliográfico de $560\text{ }^{\circ}\text{C}$, según Patnaik, P., & Knovel (2003) citado en el apartado 4.2. El sulfato de cobre pierde su última molécula de agua a $110\text{ }^{\circ}\text{C}$, por lo que es posible que se confundiera el punto de fusión con el punto de transformación de la sal hidratada en anhidra. Cabe mencionar que, aunque la sal usada de origen era anhidra, al ser una recristalización pudo haber adquirido las moléculas de agua en el proceso de recristalización. Dado que el quelado de cobre llegó a la temperatura máxima del aparato ($300\text{ }^{\circ}\text{C}$), la comparación de ambas muestras no nos aporta ninguna información útil.



En cuanto al tamaño de los cristales, sí se observa una gran diferencia entre los obtenidos de sulfato de cobre y los obtenidos de quelado de cobre, en la Tabla 4-1 se aprecia una diferencia de $0,64 \text{ cm}^2$ en el caso del sulfato de cobre a $9,1 \text{ cm}^2$ en el caso del quelado de cobre.

Al analizar el FTIR junto con el XRD, pasa lo mismo que en el caso del hierro, los múltiples picos que nos indican las múltiples geometrías existentes o las diferentes direcciones de los planos de cristalización en una misma muestra no permiten concluir una determinada estructura del quelado. En cualquier modo, sí se valoran diferencias considerables entre el quelado y el sulfato de cobre.

Siguiendo la comparativa que se ha hecho en el catión hierro con el trabajo de Clemente Vilalba, J. (2017), sería muy interesante analizar la quelación del cobre a la glicina, ya que como se concluye en su trabajo, el catión Zn^{+2} a diferencia del catión Fe^{+2} , interacciona solamente con dos glicinas y además lo hace con los nitrógenos de los grupos amino. Esta diferencia de comportamiento entre cationes divalentes con una misma molécula daría una información muy útil de cara al estudio de la quelación con otras moléculas orgánicas como en el caso que atañe a este trabajo, el ácido cítrico.

Conclusiones

Una vez realizada la discusión de los resultados y el análisis de datos descrito en el apartado anterior se concluye que:

- La cristalización de citrato de hierro a pH superiores a 3,15 no ha sido posible por los métodos usados.
- La cristalización obtenida a partir del hierro muestra múltiples posibilidades de geometría.
- Hay suficientes evidencias para decir que se cristalizó quelados de citrato de cobre, pero no para determinar su estructura e interacciones entre los grupos carboxilos.
- La cristalización del quelado de citrato de zinc no fue posible.
- Se necesitan espectros de los quelados a pH superiores al pK de sus grupos carboxilo para concluir cómo son las interacciones entre los cationes divalentes y el ácido cítrico.

Bibliografía

5.1. Referencias bibliográficas

- [1] Organización Mundial de la Salud. (2017, 4 septiembre). *10 datos sobre la nutrición*. Recuperado 25 septiembre, 2019, de <https://www.who.int/features/factfiles/nutrition/es/>
- [2] National Institutes of Health. (2017, 17 febrero). *Office of Dietary Supplements - Hierro*. Recuperado 25 septiembre, 2019, de <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Iron-DatosEnEspanol/>
- [3] Worwood, M. (2007). *Indicators of the iron status of populations: ferritin. Assessing the iron status of populations: including literature reviews: report of a Joint World Health Organization/Centers for Disease Control and Prevention Technical Consultation on the Assessment of Iron Status at the Population Level*, Geneva, Switzerland, 6–8 April 2004. World Health Organisation, Centre for Disease Control.
- [4] Organización Mundial de la Salud (OMS) (2017). *Metas mundiales de nutrición 2025: documento normativo sobre anemia* (No. WHO/NMH/NHD/14.4). Organización Mundial de la Salud.
- [5] National Institutes of Health. (2019, 14 agosto). *Office of Dietary Supplements - Cobre*. Recuperado 25 septiembre, 2019, de <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Copper-DatosEnEspanol/>
- [6] IZINCG. (2007). *Evaluación del estado de zinc de la población mediante la concentración sérica de zinc* (Informe técnico no. 2, 2007). Recuperado de https://static1.squarespace.com/static/56424f6ce4b0552eb7fdc4e8/t/574941b4d210b84cd96d8811/1464418773964/Spanish_brief2.pdf
- [7] National Institutes of Health. (2016). *Datos sobre el zinc*. Recuperado de <https://ods.od.nih.gov/pdf/factsheets/Zinc-DatosEnEspanol.pdf#search=%22cobre%22>
- [8] Peng, H., Zhang, D., Ling, X., Li, Y., Wang, Y., Yu, Q., ... & Ding, Y. (2018). n-Alkanes phase change materials and their microencapsulation for thermal energy storage: a critical review. *Energy & Fuels*, 32(7), 7262-7293.

- [9] Yañez, J., Salazar, J., Chaires, L., Jiménez, J., Márquez, M., & Ramos, E. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y perspectiva*, 21, 313-319.
- [10] Esquivel-González, B. E., Martínez, L. O., & Rutiaga-Quíñones, O. M. (2015). Microencapsulación mediante secado por aspersión de compuestos bioactivos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(2), 180-192.
- [11] Li, Y. O., González, V. P. D., & Diosady, L. L. (2014). Microencapsulation of vitamins, minerals, and nutraceuticals for food applications. *Microencapsulation in the Food Industry* (pp. 501-522). Academic Press.
- [12] Clemente Villalba, J. (2017). *Estudio de quelados de glicina mediante espectroscopía FTIR* (Master's thesis, Universitat Politècnica de Catalunya).
- [13] Ahamed, S. S., Jawahar, D., Chitedshwari, T., & Sundara, D. J. (2019). Synthesis and characterization of organic zinc chelates through FT-IR. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(4), 1217-1222.
- [14] Miller, M. E., McKinnon, L. P., & Walker, E. B. (2015). Quantitative measurement of metal chelation by fourier transform infrared spectroscopy. *Analytical Chemistry Research*, 6, 32-35.
- [15] Rammohan, A., Sarjeant, A. A., & Kaduk, J. A. (2017). Tricaesium citrate monohydrate, Cs₃C₆H₅O₇·H₂O: crystal structure and DFT comparison. *Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications*, 73(4), 520-523.
- [16] Perez, L. J., & Tobón, G. (2006). Compuestos de hierro para suplementación oral: principios y avances-revisión sistemática. *Vitae*, 13(1), 85-95.
- [17] Walco S.A. (1997). *Todo sobre los quelatos* (V.1.0;27-VII-1997). Recuperado de http://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portallG/home_4/mod_virtuales/modulo2/6.pdf
- [18] Palacios, E. G., Juárez-López, G., & Monhemius, A. J. (2004). Infrared spectroscopy of metal carboxylates: II. Analysis of Fe (III), Ni and Zn carboxylate solutions. *Hydrometallurgy*, 72(1-2), 139-148.
- [19] Delgado, R. R. (2005). *Hidroxisales de Ni y Zn: propiedades de intercambio y productos de descomposición*, (Doctoral dissertation, Universidad de Córdoba).
- [20] Pérez, J. P. P. (s. f.). *Difracción de rayos X. Introducción*. Recuperado 10 de mayo de 2020, de https://www.upct.es/~minaees/difraccion_rayosx.pdf



- [21] ChemicalBook. (2017). *Ferrous sulfate heptahydrate* | 7782-63-0. Recuperado 9 de mayo de 2020, de https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB9232125
- [22] Patnaik, P., & Knovel (Firm). (2003). *Handbook of Inorganic Chemicals*. New York, Estados Unidos: McGraw-Hill Education, 475-476.
- [23] PubChem. (2014, junio 30). *HSDB: 911*. Recuperado 12 de abril de 2020, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/911#section=Taste>
- [24] Callejas, F. R. (2000). *Tablas de Espectroscopía Infrarroja*. Departamento de física y química, UNAM.
- [25] Sigma-Aldrich, Inc. *IR Spectrum Table by Frequency Range*. (s. f.). Recuperado 5 de mayo de 2020, de <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/ir-spectrum-table.html>
- [26] Bula García, C. (2009). *Síntesis y caracterización de oxalatos de metales*. Recuperado de <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/6774/Mem%C3%B2ria.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- [27] Serna, F., Lagneau, J., & Carpentier, J. M. (2014). La diffraction des rayons X: une technique puissante pour résoudre certains problèmes industriels et technologiques. *Chim. Nouv*, 1-12.
- [28] Kalaimani. N^a, Ramya. K^b, Vinitha. G^c, Aarthi. R^d. (2019). Structural, spectral, thermal and nonlinear optical analysis of citric acid crystal. *Optik*, 192, 162960.
- [29] Anton, R., Barlow, S., Boskou, D., Castle, L., Crebelli, R., Dekant, W., . . . Toldrá, F. (2006). Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to Ferrous bisglycinate as a source of iron for use in the manufacturing of foods ad in food supplements. *Efsa Journal*, 4(1), 299.
- [30] Yunarti, R. T., Zulys, A., Harahap, L. Y., & Pramukti, M. S. A. (2013). Effectiveness of Iron Fortification on Soy-Based Foods Using Ferrous Bisglycinate in the Presence of Phytic Acid. *Makara Journal of Science*, 11-16.
- [31] Guðmundsson, A., Schlipköter, K. E., & Bäckvall, J. E. (2020). Iron (II)-Catalyzed Biomimetic Aerobic Oxidation of Alcohols. *Angewandte Chemie*, 132(13), 5441-5444.
- [32] Bio-Rad Laboratories, Inc. SpectraBase; *SpectraBase Compound ID=DwIWCTUCSb*
SpectraBase Spectrum ID=3zN2KRdz6pL
http://spectrabase.com/spectrum/3zN2KRdz6pL?a=SPECTRUM_3zN2KRdz6pL (accessed May 09, 2020).

- [33] Bio-Rad Laboratories, Inc. SpectraBase; *SpectraBase Compound ID=9lfUnkH9FJp*
SpectraBase Spectrum ID=GO7B8iCsWRp
http://spectrabase.com/spectrum/GO7B8iCsWRp?a=SPECTRUM_GO7B8iCsWRp
(accessed May 09, 2020).

